



Érica Karina de Melo Pinto

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof. Susana Isabel dos Santos Silva Sérgio Venceslau,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Paulo António Martins Ferreira Ribeiro,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria Isabel Catarino
Arguente: Doutora Quirina Tavares Ferreira
Vogal: Prof. Doutora Susana Sérgio Venceslau



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2018

Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele

Copyright © 2018 Érica Karina de Melo Pinto, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Para os meus pais.
Obrigada por tudo, sempre!

Agradecimentos

Ao fim de 5 anos seria injusto não reconhecer e agradecer aqueles que me ajudaram a chegar até aqui. Assim, gostaria de mencionar algumas das pessoas que tiveram um papel preponderante na minha formação, quer profissional ou emocionalmente.

Em primeiro lugar, um muito obrigada à minha orientadora Professora Susana Sérgio, primeiro por me ter aceite, e acima de tudo por todo o apoio, disponibilidade, dedicação incansável e toda a amizade demonstrada. Ao meu coorientador Professor Paulo António Ribeiro, por toda a ajuda, boa disposição e disponibilidade constante para repor os componentes quando estes queimavam vezes seguidas. Ao Professor Jorge Silva, por me ter permitido utilizar o Laboratório de Engenharia de Tecidos bem como os recursos necessários existentes no mesmo. Ao Sr. Eduardo, pela simpatia e prontidão sempre que necessitei da sua ajuda. Aos meus companheiros de laboratório, Tiago Cunha e Sara Pereira, por todos os cafés fora de horas, pela amizade, boa conversa e boa disposição, e ao Jorge Barreto, pelos cafés dentro de horas. Obrigada aos 3 por terem tornado estes meses mais alegres.

Mais uma vez, e porque merece ser destacada, obrigada Sara, por tudo. Pelo excelente acolhimento desde o primeiro dia, pela amizade que construímos, pelas conversas mais e menos sérias, por toda a dedicação em ajudar-me, pelos conselhos, por tudo o que aprendi e por tudo o que me proporcionaste.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer àquelas amigas que a faculdade me deu e que, durante estes 5 anos, me fizeram acreditar que eu conseguia chegar até aqui. Obrigada Sílvia e Tânia por terem tornado estes 5 anos mais fáceis, por toda a amizade e pelas vezes que me obrigaram a sair de casa para esfriar a cabeça e acalmar. Por todo o desespero e frustrações partilhados, pelos bons e maus momentos e por terem estado sempre comigo: “Tudo se faz”.

Em terceiro lugar, gostaria de agradecer àqueles amigos que não me foram dados pela faculdade, mas sim pela vida. Ao Rafael Silva, por todo o apoio, força, por repetir vezes sem conta que eu seria capaz e por ter estado sempre presente quando precisei.

Por último, mas o meu agradecimento mais profundo e eterno, à minha família e, em especial, aos meus pais. Obrigada por todo o amor, dedicação e apoio incondicionais e por tudo o que me proporcionam. Obrigada por serem para mim um exemplo a seguir e, acima de tudo, obrigada por acreditarem em mim. A vocês devo o que sou e o que serei, e por isso dedico-vos este documento.

Resumo

Nos dias de hoje, devido não só às alterações climáticas com que o mundo se depara, mas, sobretudo, às mudanças comportamentais da população, favorecendo uma maior e inadequada exposição à radiação solar, tem-se verificado um aumento progressivo da incidência do cancro da pele.

Por conseguinte, tendo em conta a complexidade da natureza do cancro, torna-se difícil encontrar formas de tratamento eficazes na remoção do tecido tumoral sem causar, simultaneamente, danos ao tecido não-cancerígeno circundante.

Assim, o presente trabalho pretendeu estudar a potencialidade da utilização do plasma frio no tratamento do cancro da pele. Para tal, desenvolveu-se uma fonte de alta tensão e um dispositivo de jato de plasma, tendo sido testadas para o efeito, diferentes configurações ao nível do dispositivo.

Considerando que o objetivo foi avaliar o potencial do plasma frio para o tratamento do cancro da pele, os ensaios celulares foram realizados para duas linhagens celulares humanas – Carcinoma de Células Escamosas e Fibroblastos Gengivais Humanos – uma cancerígena e outra não-cancerígena, respetivamente.

Durante os ensaios celulares, realizados de forma indireta, foram estudadas diferentes variáveis (número de células a utilizar, volumes de meio de cultura a utilizar e tempos de exposição), cujas influências foram avaliadas através do teste de redução da resazurina.

Os resultados obtidos demonstraram a complexidade do plasma frio uma vez que, alterações ao nível das variáveis testadas, originam diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular relativa. Por fim, estipuladas as condições de trabalho – 3 500 células por poço, 2 mL e 100 µL de meio a tratar e tratado, respetivamente - foi possível comprovar a seletividade para as células cancerígenas, tendo sido obtidas, para os 3 e 4,5 minutos de tratamento, viabilidades relativas de, aproximadamente, 50% e 30%, para a linhagem cancerígena, enquanto que para a linhagem não cancerígena observou-se uma viabilidade de cerca 90 %, para ambos os tempos.

Palavras-chave: cancro da pele; *plasma frio*; carcinoma de células escamosas; fibroblastos gengivais humanos; ensaios celulares; seletividade

Nowadays, due not only to the climatic changes that the world is facing but, mainly, to the behavioral changes of the population, favoring a greater and inadequate exposure to solar radiation, there has been a progressive increase in the incidence of skin cancer in the population.

Furthermore, considering the complexity of the cancer nature, it is difficult to find effective forms of treatment for the removal of the tumor tissue without simultaneously cause damage to the surrounding non-cancerous tissue.

Thus, the present work aimed to study the potentiality of the use of cold plasma in the treatment of skin cancer. For this purpose, a high voltage source and a plasma jet device were developed, and different configurations of this device were tested.

Considering that the goal was to evaluate the potential of cold atmospheric plasma on the treatment of skin cancer, cell assays were performed for two human cell lines - Squamous Cell Carcinoma and Human Gingival Fibroblasts - a carcinogen and another non-cancerous, respectively.

During the indirect cell assays, different variables were studied (number of cells and volumes of the culture medium to be used and also different exposure times), whose influence was evaluated through the resazurin reduction test.

The results demonstrated the complexity of cold plasma since changes in the variables tested give rise to statistically significant differences in relative cell viability. Finally, stipulated the working conditions - 3 500 cells per well, 2 mL and 100 μ L of medium to be treated and treated, respectively - it was possible to prove the selectivity to the cancer cells obtaining, for the 3 and 4,5 minutes of treatment, relative viabilities of approximately 50% and 30%, respectively for the carcinogenic line, whereas for the non-cancerous line a viability of about 90% was observed for both times.

Keywords: skin cancer; *cold atmospheric plasma*; squamous cell carcinoma; human gingival fibroblasts; cell assays; selectivity

Índice

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
GLOSSÁRIO.....	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOTIVAÇÃO.....	1
1.2. CONCEITOS TEÓRICOS	2
1.2.1. <i>Cancro da pele</i>	2
1.2.2. <i>Formas de tratamento</i>	3
2. ESTADO DA ARTE	5
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	13
3.1. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA FONTE DE TENSÃO	13
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO DISPOSITIVO DE PLASMA.....	14
3.3. PRINCÍPIO DE PRODUÇÃO DO PLASMA (CAP).....	15
3.4. ESPECTROSCOPIA ÓTICA DE EMISSÃO	17
3.5. ENSAIOS CELULARES <i>IN VITRO</i>	18
3.5.1. <i>Preparação dos Ensaios Celulares</i>	18
3.5.1.1. Linhagens Celulares	19
3.5.1.2. Cultura Celular.....	19
3.5.1.3. Preparação dos Ensaios Celulares	20
3.5.2. <i>Tratamentos Celulares</i>	22
3.5.3. <i>Teste de Viabilidade Celular</i>	26
3.5.3.1. Ensaio de Resazurina	26
3.5.3.2. Leitura da Viabilidade.....	27
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. DESENVOLVIMENTO DOS DISPOSITIVOS.....	31
4.1. FONTE DE ALIMENTAÇÃO DO PLASMA.....	31
4.1.1. <i>Fonte de Tensão DC</i>	31

4.1.1.1.	LM317	33
4.1.2.	<i>Circuito oscilador de amplitude variável e transformador flyback</i>	35
4.2.	CANETA DE JATO DE PLASMA	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	VALIDAÇÃO DOS ELÉTRODOS	47
5.1.1.	<i>Caracterização do jato de plasma</i>	47
5.1.2.	<i>Estudo da viabilidade celular para os diferentes elétrodos</i>	50
5.2.	TRATAMENTO COM O CAP: ESTUDO DAS VARIÁVEIS ASSOCIADAS	51
5.2.1.	<i>Influência do número de células</i>	52
5.2.2.	<i>Influência dos volumes de meio</i>	54
5.2.3.	<i>Influência do tempo de tratamento e seletividade</i>	56
5.3.	ESTUDO DO PH DO MEIO TRATADO	58
5.4.	ESTUDO DA TEMPERATURA DO MEIO TRATADO	58
6.	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	61
6.1.	CONCLUSÕES FINAIS	61
6.2.	TRABALHO FUTURO	64
6.3.	TRABALHOS NO ÂMBITO DA TESE	64
	BIBLIOGRAFIA	67
	APÊNDICE	73
	ANEXO	77
	DECLARAÇÃO DE ÉTICA E BOAS PRÁTICAS	83

Lista de Figuras

Figura 1.1. Esquematização dos diferentes tipos de células presentes na epiderme e representação dos diferentes tipos de cancro da pele.....	3
Figura 2.1. Princípio da produção de espécies reativas, RNS e ROS, pelo plasma.....	8
Figura 3.1. Representação esquemática geral da fonte de tensão produzida..	14
Figura 3.2. Ilustração esquemática do dispositivo produzido e dos seus componentes..	14
Figura 3.3. Variação da tensão de ruptura para diferentes gases	16
Figura 3.4. Representação esquemática do processo de ionização em cascata.	16
Figura 3.5. Câmara de Neubauer utilizada para a quantificação da suspensão celular.	21
Figura 3.6. Leitura da câmara de Neubauer.....	21
Figura 3.7. Preparação das placas de 96 poços.....	22
Figura 3.8. Processo de tratamento do meio celular pelo CAP.	25
Figura 3.9. Divisão esquemática da microplaca consoante a confluência celular.	26
Figura 3.10. Divisão esquemática da microplaca consoante o volume de meio transferido	26
Figura 3.11. Princípio de redução da resazurina em resofurina.....	27
Figura 3.12. Preparação da placa para posterior leitura da viabilidade.	28
Figura 3.13. Imagem ilustrativa de uma microplaca de 96 poços após o tempo de incubação com resazurina	28
Figura 4.1. Retificação de onda completa.....	32
Figura 4.2. Sinal à saída dos condensadores.....	32
Figura 4.3. Circuito do LM317 para regulação da tensão.....	33

Figura 4.4. Diagrama da fonte de alimentação construída.....	35
Figura 4.5. Diagrama do circuito oscilador e do transformador de linhas.....	36
Figura 4.6. Representação esquemática do MOSFET	37
Figura 4.7. Representação esquemática do transformador de linhas	38
Figura 4.8. Gráfico da tensão de saída da fonte produzida	39
Figura 4.9. Ilustração do Setup experimental do dispositivo de plasma.....	40
Figura 4.10. Ilustração das configurações testadas para o tubo de confinamento	40
Figura 4.11. Jato de plasma obtido para diferentes elétrodos testados	41
Figura 4.12. Esquema e dimensões do revestimento dimensionado para o dispositivo.	42
Figura 4.13. Esquema e dimensões do extensor dimensionado para acoplar o dispositivo ao posicionador.....	42
Figura 4.14. Representação do dispositivo final.....	43
Figura 4.15. Representação do <i>setup</i> final e do jato de plasma produzido.	44
Figura 5.1. Caracterização do jato de plasma para os 3 elétrodos diferentes	48
Figura 5.2. Viabilidades relativas obtidas para os diferentes elétrodos.....	50
Figura 5.3. Efeito do tratamento com o CAP para diferentes confluências celulares	53
Figura 5.4. Efeito do CAP para diferentes volumes de meio.....	55
Figura 5.5. Seletividade do tratamento com o CAP e influência do tempo de tratamento.	56
Figura 5.6. Temperatura (°C) do meio após exposição ao plasma até 270 segundos.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Sumário de fontes de plasma em utilização	12
Tabela 3.1. Representação das diferentes variáveis testadas nos tratamentos.....	23
Tabela 4.1. Tensão de saída da fonte a partir da tensão variável na fonte de alimentação.....	38
Tabela 5.1. Medição do pH do meio antes e após a exposição ao plasma, CAP.....	58

Glossário

CAP – *Cold Atmospheric Plasma*

CEFITEC – Centro de Física e Investigação Tecnológica

DC – Corrente Contínua (*Direct Current*)

UV – Ultravioleta

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

SCC – Carcinoma de Células Escamosas (*Squamous Cells Carcinoma*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species*)

RNS – Espécies Reativas de Azoto (*Reactive Nitrogen Species*)

RF – Radiofrequência

APPJ – *Atmospheric Pressure Plasma Jet*

ZVS – *Zero-Voltage Switching*

AC – Corrente Alternada (*Alternating Current*)

L1 – Enrolamento primário do transformador de linhas

L2 - Enrolamento secundário do transformador de linhas

Vout – Tensão de Saída

HGF-1 – Fibroblastos Gengivais Humanos (*Human Gingival Fibroblast*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

FBS – *Fetal Bovine Serum*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

MOSFET – *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*

G - *Gate*

D – Dreno (*Drain*)

HV – Alta Tensão (*High Voltage*)

PLA – Ácido Polilático (*Polylactic Acid*)

TE₅₀ – Tempo de Exposição para uma redução da viabilidade celular de 50%

1. Introdução

Neste capítulo é feita uma breve contextualização, seguida da descrição do objetivo da presente dissertação e do problema que a mesma se propõe a solucionar. Posteriormente, são apresentados os fundamentos teóricos considerados fundamentais para um melhor enquadramento e entendimento de todo o trabalho que se segue.

1.1. Motivação

Atualmente, devido essencialmente à mudança de comportamento da população favorecendo uma maior e inadequada exposição à radiação solar, nomeadamente ultravioleta, tem-se verificado um aumento progressivo da incidência de cancro da pele. De acordo com estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS), um em cada três cancros diagnosticados corresponde a cancro da pele. Em termos globais, anualmente ocorrem entre dois a três milhões de cancro da pele, sendo este considerado o cancro com maior incidência a nível mundial [1].

Dada a complexidade da natureza do cancro, torna-se difícil encontrar tratamentos que originem a apoptose das células cancerígenas, sem que o tecido saudável circundante seja também afetado. Este facto, aliado à possibilidade dos tumores desenvolverem uma resistência aos fármacos aquando do tratamento por quimioterapia, vem enaltecer a necessidade de se descobrir técnicas de tratamento mais eficazes, precisas, seguras e minimamente invasivas. É neste contexto, que o plasma surge como possível complemento e/ou alternativa às técnicas existentes atualmente, tendo vindo a demonstrar, nos diversos estudos já realizados, uma elevada seletividade para as células cancerígenas.

Até a data, não foi reportada qualquer resistência por parte das células cancerígenas ao CAP (do inglês, *cold atmospheric plasma*), o que vem enfatizar a possibilidade de que a utilização desta técnica pode vir a ser um fator-chave nos tratamentos cancerígenos, podendo vir a ser combinado com as terapias que se encontram atualmente em utilização (e.g. radioterapia, quimioterapia, entre outras).

Deste modo, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um dispositivo de jato de plasma frio, de árgon, à pressão atmosférica e foi realizado no laboratório de Plasma e Aplicações, do CEFITEC. O protótipo produzido foi dimensionado com o intuito de reunir as condições necessárias para que possa ter aplicações médicas, nomeadamente, no tratamento do cancro da pele.

Ao nível do dispositivo, foram testadas diferentes configurações, referentes à disposição e forma dos elétrodos, e foi efetuado o seu revestimento com um material isolador, de modo a tornar seguro o seu manuseamento. A fase seguinte, consistiu na colocação do dispositivo num suporte, que foi dimensionado tendo em conta a aplicação desejada, onde foram adaptados um posicionador e uma craveira digital. Assim, foi possível tornar o sistema mais automático, como no caso do posicionamento da sonda, e mais preciso, a nível da determinação da distância sonda-alvo. Em paralelo, foi construída uma fonte de alta tensão DC que permite monitorizar a tensão (de 0 a 20 kV) e a corrente (0 a 20 mA) aplicadas.

Na fase final deste trabalho e de forma a validar a aplicação pretendida, o *setup* desenvolvido foi testado e otimizado em ensaios com culturas de células cancerígenas e não cancerígenas humanas - Carcinoma de Células Escamosas, a segunda forma mais comum de cancro da pele, e Fibroblastos Gengivais Humanos, respetivamente.

1.2. Conceitos Teóricos

1.2.1. Cancro da pele

O cancro da pele corresponde a um crescimento descontrolado de células da pele anómalas. Numa situação normal, as células das várias camadas da pele, multiplicam-se e, posteriormente, morrem (apoptose), existindo assim um processo de renovação celular permanente. O cancro da pele ocorre como consequência da perturbação do normal ciclo de vida celular [2].

De entre as possíveis causas para o aparecimento do cancro da pele, a mais comum diz respeito à exposição inadequada à radiação ultravioleta (UV). Quando há irradiação do tecido vivo acima do normal, ocorre uma disrupção da estrutura molecular do mesmo dando lugar a uma série de reações inesperadas e que, consequentemente, vão originar o aparecimento e o desenvolvimento de células indesejadas. Estas células surgem como resultado da formação de radicais livres na molécula do DNA e resultam assim no aparecimento de cancro da pele [2,3].

O cancro da pele é dividido em três formas principais: melanoma, carcinoma de células basais e **carcinoma de células escamosas** (do inglês, *Squamous Cells Carcinoma* – SCC). Para este trabalho a manifestação de interesse é o carcinoma de células escamosas, que corresponde a um crescimento descontrolado e anômalo de células e ocorre na região constituída pelas células escamosas - epiderme (Figura 1.1) [4].

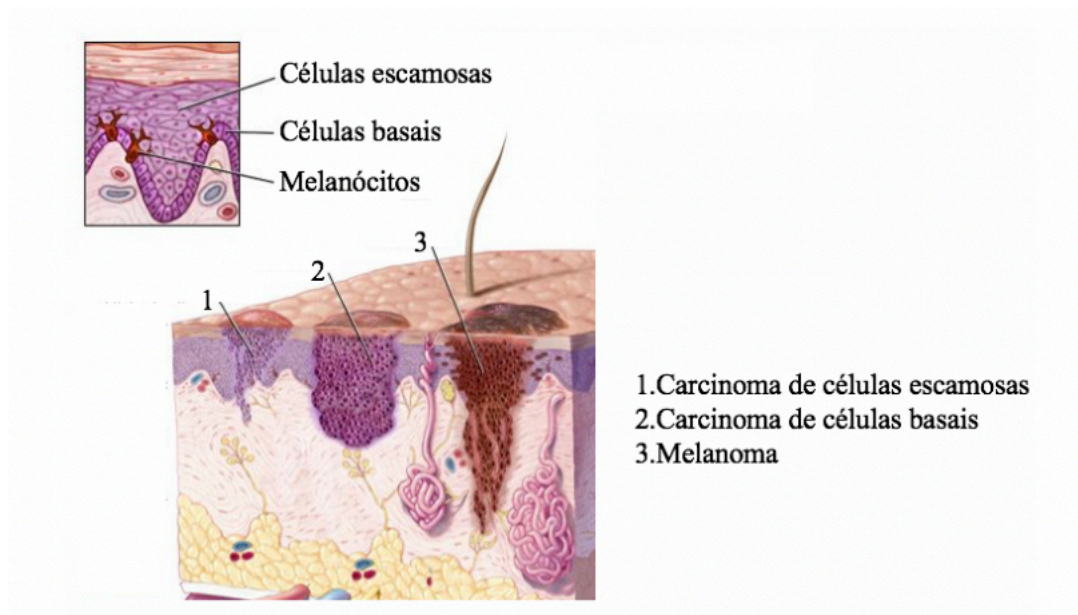


Figura 1.1. Esquematização dos diferentes tipos de células presentes na epiderme (células escamosas, basais e melanócitos) e representação dos diferentes tipos de cancro da pele. É possível visualizar não só os diferentes tipos de cancro da pele bem como a profundidade de cada um. Adaptado de [5].

1.2.2. Formas de tratamento

O SCC, se for detetado na sua fase inicial, pode ser completamente removido e sem a ocorrência de grandes complicações. Nos dias de hoje existem diferentes possibilidades de tratamento que são selecionadas tendo em conta diversas características: o estadio da doença, tamanho, localização, profundidade, entre outros.

De entre as diferentes possibilidades atualmente existentes, destacam-se:

Cirurgia de excisão- o médico remove todo o tumor visível, incluindo uma camada circundante de pele aparentemente normal, como margem de segurança. A região é de seguida suturada e o

material segue para análise para verificar se há indícios de tecido tumoral remanescente. Em caso afirmativo o processo é repetido;

Curetagem e eletrocoagulação- o procedimento é feito de forma repetida e faseada. É retirada uma parte do tumor e com o bisturi elétrico é feita a cauterização da zona, de forma a destruir um possível tumor residual e controlar o sangramento. O procedimento vai sendo repetido em camadas cada vez mais profundas, de modo a garantir que não há vestígio de células cancerígenas. As taxas de sucesso desta técnica encontram-se próximas das taxas de excisão;

Criocirurgia- o tecido tumoral é destruído através do congelamento com azoto líquido. Trata-se de um procedimento não invasivo e sem sangramento e que pode ter de ser repetido algumas vezes durante uma mesma sessão, de forma a garantir que todo o tecido foi destruído. Após o processo ocorre aparecimento de crostas no tumor e ao fim de algum tempo o mesmo cai. Trata-se de um procedimento barato e consideravelmente fácil de administrar, no entanto, pode provocar algum inchaço e vermelhidão e possui taxas de sucesso bastante inferiores às das técnicas com intervenção cirúrgica;

Radioterapia- feixes de raios X são direcionados para o tumor. Esta técnica não proporciona controlo preciso na identificação e remoção das células cancerígenas residuais na periferia do tumor. A destruição do tumor normalmente requer um número considerável de exposições à radiação, o que acarreta riscos bem como uma elevada probabilidade de afetar simultaneamente o tecido saudável [6].

Todas as possibilidades acima descritas apresentam desvantagens ou a nível de taxas de sucesso e consequente erradicação do tecido tumoral, ou pelo facto de possuírem efeitos secundários, serem invasivas, relativamente dolorosas e serem dispendiosas. Tal facto vem aumentar a necessidade de uma nova técnica, que consiga aliar uma elevada taxa de sucesso a uma alta seletividade para as células cancerígenas, surgindo assim como potencial solução o CAP.

2. Estado da Arte

Neste capítulo é apresentada a revisão bibliográfica acerca do assunto, passando pelos conceitos e descobertas principais e justificando a necessidade e a pertinência do presente trabalho.

O plasma é um gás parcialmente ionizado, considerado como o quarto estado da matéria e o mais abundante no universo (99%), estando presente em diferentes fenómenos naturais (relâmpagos, auroras boreais, etc.), bem como no dia-a-dia (lâmpadas fluorescentes, monitores de plasma, etc.) [7].

O primeiro registo que se tem da descoberta do plasma é de 1879 por William Crookes [8]. Este, através de um tubo (tubo de Crookes) identificou uma matéria que designou por “matéria radiante”. No entanto, apenas em 1928 o plasma foi efetivamente designado como plasma por Irving Langmuir, devido à analogia efetuada entre células suspensas no plasma sanguíneo e os iões, eletrões e outras partículas excitadas e carregadas que se encontram suspensas no gás ionizado [9].

Descrito como uma substância gasosa (produzido a partir de hélio, árgon, entre outras possibilidades) onde parte das suas partículas se encontram ionizadas, o plasma pode ser obtido com composições diferentes, tendo em conta o processo e os parâmetros utilizados na sua produção, tal como veremos ao longo do trabalho. Por norma, o plasma é constituído por diversos componentes ativos incluindo partículas carregadas (e.g. iões e eletrões) e neutras, radicais, espécies altamente reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive Oxygen Species* - ROS) e de azoto (do inglês, *Reactive Nitrogen Species* - RNS), ozono, fotões UV, entre outros [10].

O plasma é utilizado há já muitos anos com aplicações diversas, nomeadamente: esterilização de equipamento médico, indústria alimentar, coagulação sanguínea, tratamento de feridas, modificação do material de superfícies, entre outros [2-8]. Esta multifuncionalidade apresentada ad-vém, em parte, da sua elevada efetividade como bactericida demonstrada em diversos estudos [9-13]. Mais recentemente, as aplicações do plasma ao nível biológico e/ou biomédico começaram a representar uma área de grande interesse.

A interação dos componentes constituintes do plasma acima citados com micro-organismos pode originar diferentes efeitos, dos quais se destacam:

Efeito químico: as ROS oxidam e causam o rompimento da membrana celular podendo levar à morte celular (stress oxidativo);

Efeito físico: os iões provocam um aumento do potencial à superfície dos micro-organismos, originando uma tensão eletrostática entre as diferentes camadas da parede celular. Quando essa tensão ultrapassa a resistência à tração da parede celular, ocorre uma rutura da mesma podendo levar à morte celular – disrupção eletrostática;

Efeito neutralizador: o plasma neutraliza a parede celular que, por natureza, se encontra negativamente carregada. Essa neutralização origina uma dispersão do citoplasma que poderá desencadear a morte celular (há uma alteração no ambiente líquido da célula);

Efeito dos fotões: fotões UV provocam danos na membrana celular podendo originar necrose celular.

Os efeitos supracitados podem ocorrer tanto em células não-cancerígenas (sãs) como em células cancerígenas. Assim, há uma necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de interação do plasma com o tecido vivo, de forma a que este possa ser utilizado em contexto clínico de modo seguro [7].

No plasma, os seus constituintes podem possuir temperaturas diferentes uns dos outros. A temperatura do plasma reflete, principalmente, a temperatura dos iões, das moléculas sem carga ou das partículas pesadas e não a temperatura dos eletrões. Consequentemente, o plasma é classificado tendo em conta se os eletrões se encontram, ou não, em equilíbrio térmico com as restantes partículas (iões) [10].

Deste modo, o plasma subdivide-se em plasma térmico e plasma frio ou, como é mais conhecido, **CAP** (do inglês, *Cold Atmospheric Plasma*). No plasma térmico, os eletrões e as partículas pesadas (e.g. iões) encontram-se em equilíbrio térmico, i.e., possuem a mesma temperatura. Já no CAP, os eletrões apresentam temperaturas elevadas, enquanto que os restantes constituintes apresentam uma temperatura muito inferior (associada à fraca ionização). No CAP, o arrefecimento dos iões e moléculas não carregadas é mais efetivo que a transferência de energia por parte dos eletrões [14]. Logo, a temperatura resultante do plasma (dada pela temperatura dos

iões) é bastante inferior ($\approx 30^\circ \text{C}$, próxima da temperatura ambiente) relativamente à dos eletrões [15–19].

A utilização do plasma na medicina ocorre já há alguns anos. No entanto, essas aplicações baseavam-se principalmente nos efeitos térmicos do plasma (plasma térmico), como é o caso da coagulação sanguínea. O facto de possuir temperaturas elevadas (muito acima dos 40°C) limitava a sua aplicação à medicina, devido à possibilidade de, quando em contato com o tecido vivo, originar efeitos adversos como irritações e queimaduras [1,4-5]. Assim, a descoberta do CAP vem pôr fim a esta limitação, uma vez que se tornou possível obter plasma a temperaturas relativamente baixas.

Stoffels *et al.* [20] veio apresentar a possibilidade de aplicações promissoras do CAP no contexto biomédico, demonstrando que o mesmo pode interagir com os materiais sem causar danos térmicos à superfície. Esta descoberta veio incitar um vasto leque de estudos e experiências com vista à expansão das aplicações do plasma ao nível da medicina, não só pelo facto deste produzir resultados relativamente rápidos mas, sobretudo, devido aos efeitos biológicos que podem ser causados pelos seus constituintes quando em contato celular e que, dependendo do objetivo, podem ser de extrema importância [18].

Mais recentemente foram desenvolvidas novas e diferentes fontes capazes de produzir CAP com uma temperatura inferior aos 40°C no ponto de aplicação, tornando possível a sua utilização em tecidos humanos. Adicionalmente, Keidar *et al.* [21] demonstrou que o calor que é dissipado pelo plasma pode causar um pequeno aumento da temperatura das células não-cancerígenas (houve um aumento de 2°C), no entanto, o mesmo não é suficiente para causar danos térmicos.

Atualmente, pensa-se que dos possíveis efeitos biológicos acima descritos da interação do plasma, os fundamentais no contexto do CAP sejam os químicos e os neutralizadores, sendo a contribuição dos restantes efeitos bastante reduzida [22]. A importância da aplicação do plasma à medicina torna-se irrefutável uma vez que, cada vez mais, estudos apresentam resultados onde se comprova a sua eficácia, principalmente na área do tratamento oncológico [2-3,14-23]. Tendo em conta os diferentes estudos realizados, é seguro dizer-se que a eficácia dos resultados obtidos está dependente, entre muitos fatores, do tempo de exposição, sendo necessário determinar a duração de cada tratamento.

Estudos recentes [11,18, 24-25] vêm demonstrar que a interação do CAP com os tecidos biológicos é capaz de eliminar as células alvo sem originar a necrose do tecido. O CAP tem

demonstrado uma seletividade para as células cancerígenas que, segundo a maioria dos estudos já realizados (*in vivo* e *in vitro*), está relacionada, em parte, com a produção de ROS e RNS (que ocorre quando o plasma entra em contato com o ar) e também com a fase do ciclo celular em que as células se encontram [11,17,18, 26, 27].

Tal como já foi referido, o plasma contém na sua composição diversos componentes, entre os quais se encontram as espécies reativas de oxigénio (e. g. OH^\bullet , O_3 , $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , entre outras) e as espécies reativas de azoto (e.g. NO , NO_2 , entre outras), tal como esquematizado na Figura 2.1. Em particular, estes são os constituintes do plasma considerados mais importantes no âmbito das aplicações biomédicas e dos efeitos biológicos, vindo ultimamente a ser dado algum protagonismo ao peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [31–33]. O H_2O_2 é conhecido como sendo bastante tóxico para as células e por causar danos ao nível da molécula do DNA [35]. No entanto, é importante salientar que estas espécies não atuam individualmente, o “processo-chave” está na sua interação coletiva.

Em concentrações moderadas, estas espécies reativas, de oxigénio e azoto, apresentam um papel importante na proteção e defesa celular. No entanto, a exposição ao CAP leva a um aumento da quantidade de RNS e ROS nas células, desencadeando um stress oxidativo que poderá originar danos a nível celular, nomeadamente no DNA, podendo levar à ativação da cadeia apoptótica (morte celular programada) [34, 35].

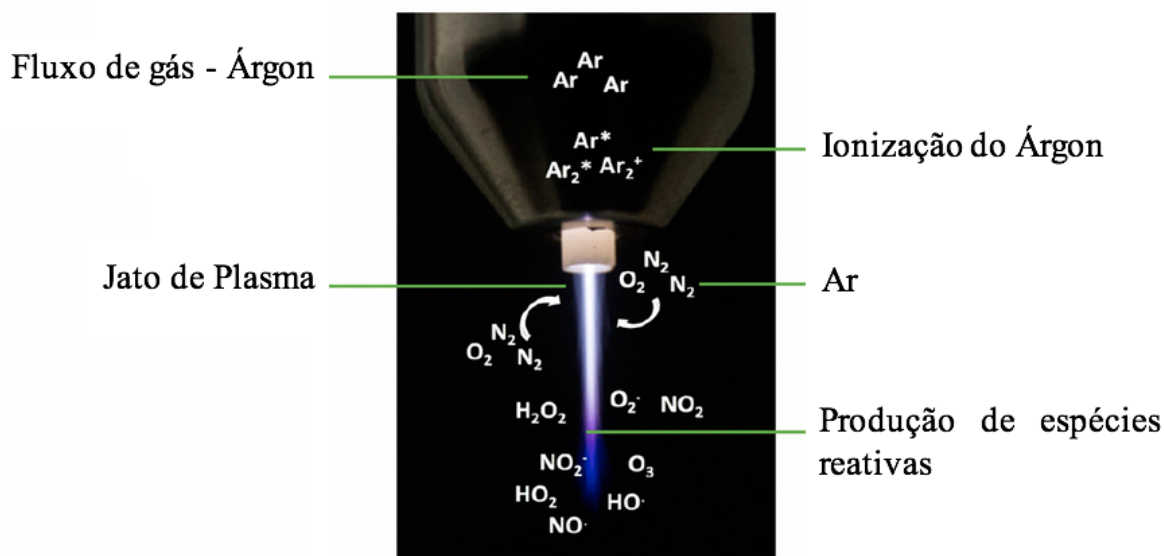


Figura 2.1. Princípio da produção de espécies reativas, RNS e ROS, pelo plasma. Adaptado de [34].

Entre as células cancerígenas e sãs sujeitas ao CAP verificou-se que a quantidade de espécies reativas obtidas após a exposição era superior nas células cancerígenas [24,27]. Logo, uma vez que as células cancerígenas expostas apresentam uma maior quantidade destas espécies, possuem, assim, uma maior probabilidade de morte celular (desencadeada por stress oxidativo).

Embora já tenha sido validada a hipótese de as espécies reativas terem um papel crucial nos efeitos biológicos obtidos, ainda não se conseguiu descobrir que componente, em particular, é o causador do stress oxidativo gerado.

Diversos estudos continuam a ser desenvolvidos de forma a assegurar que a sensibilidade das células cancerígenas à exposição do plasma é diferente da sensibilidade apresentada por células sãs [3,14,27,28]. Em testes realizados com células bacterianas (cuja resposta aparenta ser semelhante à das células tumorais) e células eucarióticas (em representação das células saudáveis), observou-se que efetivamente era possível originar a apoptose das células bacterianas, no entanto, o mesmo não acontecia às células eucarióticas. As células eucarióticas, devido aos mecanismos de defesa que possuem, necessitam de tempos de exposição muito mais elevados para que o mesmo efeito ocorra [27].

Volotskova *et al.*[25] reportou que o aumento da sensibilidade das células cancerígenas ao CAP deve-se também às diferenças na distribuição ao longo do ciclo celular dessas mesmas células relativamente às células sãs. Assim, demonstrou que os resultados obtidos pelo tratamento com o CAP encontram-se não só dependentes da duração do tratamento e da composição química do plasma (foi utilizado plasma produzido a partir de hélio), como também do número de células na amostra tratada que se encontram na fase-S (fase do ciclo celular em que ocorre a replicação do DNA). O facto das células cancerígenas se encontrarem maioritariamente na fase-S (cerca de 40-50%, enquanto que nas células normais apenas 10-15%), devido à elevada taxa de proliferação que apresentam, vem contribuir para a seletividade do CAP. Este estudo baseou-se no facto de já ter sido comprovada a relação existente entre as ROS e a resposta celular.

Assim, de forma a validar a hipótese da dependência em relação à fase-S, foi utilizado um indicador de stress oxidativo como revelador de danos nessa fase em particular. Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo e mais pronunciado do indicador na fase-S, vindo assim a validar a suspeita de que os efeitos do CAP são também dependentes da fase do ciclo celular em que as células tratadas se encontram. Uma vez que os efeitos são maioritariamente obtidos em células na fase-S (fase predominante das células cancerígenas), obtém-se uma diminuição da progressão celular como resultado do abrandamento da replicação do DNA por indução da apoptose.

Deste modo, conclui-se que o CAP é capaz de provocar não só a ativação da cadeia apoptótica através de danos oxidativos nas células cancerígenas, mas também uma diminuição da replicação do DNA nas mesmas células. É essa elevada seletividade apresentada aquando da sua aplicação que faz com que seja considerado uma potencial alternativa aos tratamentos do cancro já existentes podendo, adicionalmente, ser combinada com as técnicas convencionais de modo a fornecer melhores resultados e minimizar os danos causados às células saudáveis.

No contexto do CAP diferentes abordagens têm sido utilizadas de forma a avaliar a sua eficácia no tratamento de células cancerígenas. Atualmente, uma nova metodologia para o tratamento com o CAP tem vindo a ser testada ao nível dos testes *in vitro* e é conhecida como um tratamento de forma indireta. Na forma direta, as células são expostas diretamente ao plasma por um determinado período de tempo; já no tratamento indireto, apenas o meio de cultura celular é exposto ao plasma e, posteriormente, uma determinada quantidade de meio tratado (exposto ao plasma) é transferida para os poços onde as células se encontram cultivadas. As interações do plasma com o meio celular vão resultar na dissolução e/ou difusão das espécies reativas no mesmo. No entanto, uma vez que estas espécies apenas permanecem ativas durante um período de tempo limitado, é necessário ter em conta que esse facto irá condicionar a duração da efetividade do meio tratado.

De acordo com a literatura, não são verificadas diferenças significativas ao nível dos resultados quando o tratamento é efetuado quer de forma direta quer de forma indireta, tornando assim estas duas técnicas equivalentes e válidas para a realização dos ensaios [35]. É importante salientar que o tratamento pelo método indireto acarreta como vantagens o facto do meio tratado poder ser injetado podendo assim alcançar e, conseqüentemente, tratar tecidos que por irradiação direta não seria possível aceder e ainda o facto de permanecer ativo/efetivo durante algum espaço de tempo.

Ao longo da maioria dos estudos *in vitro* e *in vivo* já realizados, tem-se obtido uma irradiação seletiva das células cancerígenas e uma diminuição do tamanho do tumor, respetivamente [2, 17, 18, 20, 22, 25]. Tendo em consideração os diversos estudos e revisões realizadas acerca do assunto [14, 22, 23], pode-se dizer que os resultados obtidos para além de apresentarem uma dependência em relação ao tempo de exposição, têm dado indícios de que os efeitos da utilização do CAP são uniformes. Isto é, os resultados citados (tanto *in vivo* como *in vitro*) têm sido obtidos para diferentes tipos de cancro - melanoma, glioblastoma, cancro a nível do pâncreas, pulmão, próstata, entre outros [2, 19, 21, 26, 28, 30].

No entanto, ao longo dos estudos não se tem verificado uma igualdade nas condições e nos parâmetros utilizados (modo de obtenção do plasma, dispositivo de plasma, composição do plasma, condições de aplicação, tempo de exposição, entre outros), pelo que foi observado que parâmetros diferentes vão originar efeitos diferentes [10]. Essa heterogeneidade é observada pelo facto de existirem ainda lacunas ao nível do entendimento do princípio ativo do CAP na interação celular, uma vez que este campo é relativamente recente e a sua caracterização bastante complexa.

Deste modo, tem-se procurado cada vez mais aumentar a especificidade/seletividade das suas aplicações sendo, para isso, necessários estudos adicionais de modo a estabelecer uma relação de causalidade ao nível dos constituintes do plasma e dos efeitos causados.

Ao nível das fontes de CAP, as existentes atualmente são, na sua maioria, apenas para uso experimental. Na Europa, apenas quatro dispositivos se encontram disponíveis como dispositivos médicos. As respetivas creditações foram atribuídas com base em observações e estudos clínicos realizados. Nenhum desses dispositivos possui licença para o ramo oncológico, sendo as suas aplicações principalmente dermatológicas [4, 26].

As fontes de CAP são divididas em categorias distintas (fonte de plasma direto, indireto e híbrido) tendo em conta o princípio de produção e a aplicação pretendida.

Neste trabalho, em particular, foi produzida uma fonte de plasma indireto, que é o tipo de fonte mais utilizado quando se procura um tratamento bastante direcionado tal como no caso da oncologia. As principais vantagens deste tipo de fontes prendem-se ao facto de se conseguir obter uma coluna de plasma consideravelmente estável e controlável no meio externo [22].

Neste método, o plasma é produzido entre dois elétrodos e, posteriormente, transportado sob a forma de jato de plasma para a área de aplicação, por um fluxo de gás. Na Tabela 2.1, é possível observar um resumo das propriedades de algumas fontes de plasma indireto utilizadas, assim como as suas aplicações.

Tabela 2.1. Sumário de fontes de plasma em utilização. Adaptado de [13].

Fonte de Plasma	Dispositivo	Gás	Frequência	Fluxo	Tensão de Alimentação/ Potência	Aplicação
Jet	kINPen [®] MED	Ar	1-1,5 MHz	3-8 slm	1-6 kV	- Psoríase - Melanoma - Cicatrização de feridas
Jet	Dispositivo personalizado	He	230-270 kHz	2 slm	1,1-1,8 kV	- Melanoma
Jet	Dispositivo personalizado	He	RF 25 kHz Pulsado 400hz	16.6 slm	25 kV	- Cicatrização de feridas
Jet	RF APPJ	Ar	13,56 MHz	1.5 slm	1,7 W	- Antibacteriano - Feridas infectadas

Ar árgon, *RF* radiofrequência, *APPJ* atmospheric pressure plasma jet, *slm* standard liter per minute

Devido à amplitude das possíveis aplicações destas fontes, nos últimos dez anos, verificou-se uma forte intensificação dos estudos para o desenvolvimento de novos dispositivos. A grande variedade das aplicações leva a uma diversidade não só no dimensionamento como também nas condições a utilizar nos dispositivos. É difícil determinar um protocolo *standard*, sendo necessário efetuar diferentes conjugações de parâmetros, de modo a verificar quais as condições ótimas, uma vez que, alterações na tensão, tipo de gás, frequência, tempo de exposição, entre outros, vão ter implicações diretas no resultado obtido [4, 5, 22].

A primeira fonte deste método capaz de produzir plasma a baixas temperaturas foi reportada por Stoffels *et al.* e é designada como “*plasma needle*” [20]. Em 2005, Foest *et al.* desenvolveu duas novas versões de jatos de plasma na gama das Radiofrequências (RF) [37]. Em particular, a segunda versão é de especial interesse uma vez que apresenta uma configuração semelhante à que foi desenvolvida neste trabalho, tal como pode ser visto na secção 3.2 - Caracterização do dispositivo de plasma.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial do CAP para o tratamento do cancro, mais especificamente, do cancro da pele. Deste modo, foi dimensionada e, posteriormente, construída uma fonte de alta tensão bem como uma fonte de CAP, utilizando como gás de alimentação o árgon (Ar). Uma vez construídos ambos os dispositivos, foram testados e ajustados diferentes parâmetros, com vista à obtenção das melhores condições para a aplicação pretendida.

3. Procedimento Experimental

Nesta secção é feita uma breve explicação dos dispositivos produzidos, bem como do seu modo de funcionamento. É igualmente explicado o modo de caracterização do plasma obtido e todo o procedimento experimental ao nível dos testes de viabilidade celular realizados de forma a validar o dispositivo desenvolvido.

3.1. Princípio de funcionamento da fonte de tensão

Tal como referido, este trabalho pressupõe, para além da construção do dispositivo de jato de plasma, o dimensionamento e posterior construção de uma fonte de alta tensão, contínua e variável.

Desse modo, foi construída uma fonte de tensão contínua (DC) variável, de 0 a 20 kV, e com uma corrente máxima de aproximadamente 20 mA. A fonte foi dimensionada tendo como base o esquema geral da Figura 3.1, e é essencialmente constituída por:

- i. Fonte de tensão DC – alimentada pela tensão da rede e dimensionada de modo a produzir uma tensão contínua variável até 20 V;
- ii. Circuito oscilador – circuito condutor do transformador de linhas (também conhecido como ZVS, *Zero-Voltage Switching*);
- iii. Transformador de linhas (*flyback*) – transformador inversor de razão 1:1000 destinado a elevar a tensão até cerca de 20 kV;
- iv. Retificador – acoplado ao transformador de linhas, é responsável pela conversão da tensão alternada (AC), proveniente do transformador, em contínua.

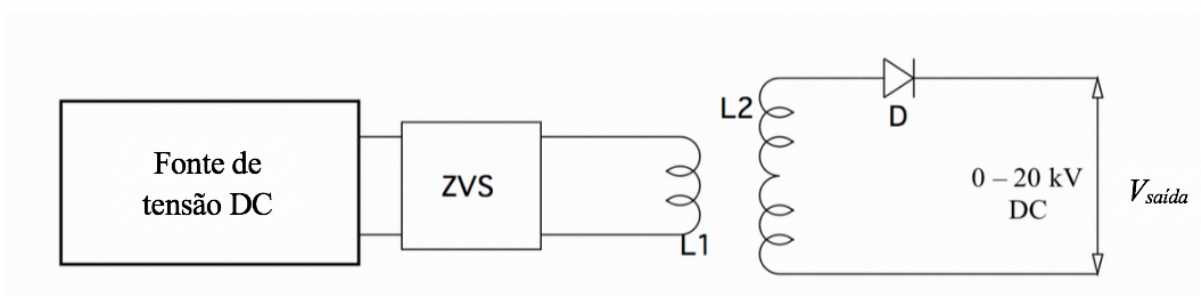


Figura 3.1. Representação esquemática geral da fonte de tensão produzida. A fonte é constituída por uma fonte de tensão DC, alimentada à tensão da rede (220 AC) e que produz uma tensão de saída contínua variável. Essa fonte alimenta o circuito oscilador (ZVS) que se encontra acoplado ao primário do transformador de linhas, L1. À direita, encontra-se o secundário do transformador de linhas, L2, ligado ao retificador (diodo, D) que é responsável pela conversão da tensão obtida no transformador de alternada para contínua.

3.2. Caracterização do dispositivo de plasma

Tal como já foi referido, o objetivo desta tese foi o desenvolvimento de uma fonte de plasma indireto, muitas vezes designada como “*cold atmospheric plasma jet*” ou “caneta de jato de plasma”.

O dispositivo, tal como pode ser visto na Figura 3.2, é constituído, de uma forma geral, por um tubo de descarga que se encontra acoplado a um par de eléctrodos. Um dos eléctrodos é uma agulha metálica que é colocada no centro do tubo e, por norma, termina alguns centímetros antes do fim do tubo. O segundo eléctrodo é constituído por um anel metálico que se encontra fixo à zona exterior do tubo. As paredes do tubo funcionam como um isolador, não permitindo que haja contacto entre o segundo eléctrodo e o plasma gerado [38].

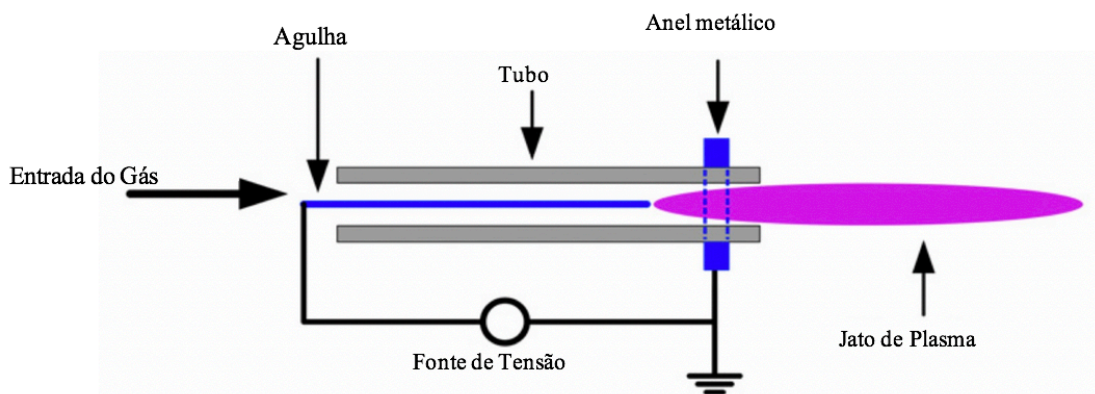


Figura 3.2. Ilustração esquemática do dispositivo produzido e dos seus componentes: tubo exterior, dois eléctrodos, sendo um constituído por uma agulha metálica e introduzido no interior do tubo, e o segundo por um anel metálico colocado no exterior do tubo. É possível visualizar o local de entrada do gás bem como as ligações à fonte de tensão. Adaptado de [38].

Este trabalho, numa fase inicial, foi desenvolvido em conformidade com o esquema da Figura 3.2, contendo a entrada para o gás (árgon), o tubo de confinamento do gás (tubo de borossilicato) e os dois elétrodos com disposição semelhante à do esquema. No entanto, foram igualmente testadas diferentes configurações para o tubo e para os elétrodos, em particular, para o anel metálico, no sentido de determinar qual a que produzia os melhores resultados (jato de plasma com as características necessárias à aplicação pretendida).

3.3. Princípio de produção do plasma (CAP)

Uma vez que se trata de plasma à pressão atmosférica, é necessário um campo elétrico elevado para iniciar a descarga ao longo do gás. Quando o árgon (que possui na sua constituição eletrões e iões) flui através do tubo e, simultaneamente, é ligada a fonte de alimentação de alta tensão, um jato de plasma frio é gerado caso a tensão aplicada seja superior à tensão de disrupção (valor dependente da distância entre os elétrodos, da pressão do gás e do gás em causa, de acordo com a Lei de Paschen), que corresponde à tensão necessária para tornar o gás eletricamente condutor, ou seja, para produzir uma descarga no árgon.

Tal como referido, de acordo com a Lei de Paschen, a variação da tensão de disrupção é função do produto entre a pressão do gás e a distância entre os elétrodos, Figura 3.3, e pode ser obtida através da Equação 3.1:

$$V_d = \frac{C_1 \times (p \times d)}{C_2 + \ln(p \times d)} \quad (3.1)$$

onde, V_d corresponde à tensão de disrupção, C_1 e C_2 são constantes características do gás determinadas experimentalmente, e p e d representam a pressão e distância entre os elétrodos, respetivamente [39].

Com um aumento da pressão e da distância entre os elétrodos, verifica-se uma tendência para um comportamento linear, isto é, a tensão de disrupção é aproximadamente proporcional ao produto da pressão pela distância entre ambos os elétrodos. Para pressões mais baixas há um aumento dessa tensão. Isto porque, a baixa pressão, é menor a frequência de colisões (eletrões possuem um maior percurso livre médio).

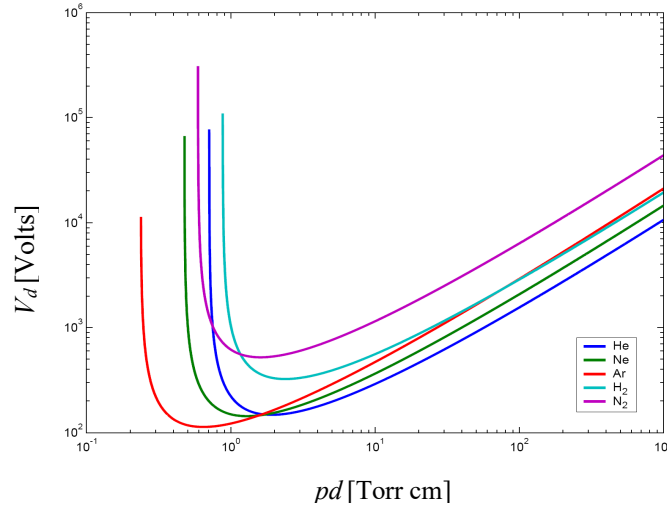


Figura 3.3. Variação da tensão de ruptura para diferentes gases em função da pressão utilizada e distância entre elétrodos. O eixo das ordenadas representa a tensão de ruptura, V_d , e o eixo das abcissas o produto da pressão, em torr, pela distância, em cm, pd [39].

A aplicação de um campo elétrico ao gás transfere energia térmica para o mesmo e, consequentemente, os seus eletrões são acelerados adquirindo uma elevada energia cinética (visto que possuem uma massa reduzida). Estes eletrões deslocam-se de forma livre e vão funcionar como portadores de carga. Ao deslocarem-se, colidem com os átomos e moléculas do gás e/ou com a superfície dos elétrodos podendo originar novos eletrões livres (processo de ionização) e criar assim iões atómicos e moleculares positivamente carregados. Origina-se, assim, um processo de ionizações em cascata: os novos eletrões criados são de seguida acelerados pelo campo elétrico que está a ser aplicado e vão, por sua vez, sofrer também colisões originando novamente a ionização de átomos e moléculas, tal como esquematizado na Figura 3.4, [40].

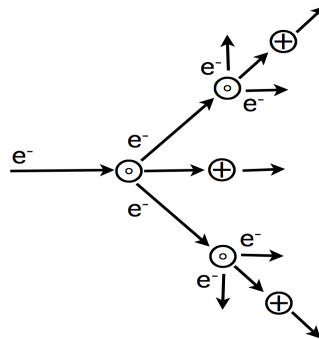


Figura 3.4. Representação esquemática do processo de ionização em cascata - o eletrão, ao ser acelerado pelo campo elétrico, sofre colisões originando novos eletrões livres que, por sua vez, vão desencadear novos eletrões e assim sucessivamente [40].

Deste modo, o jato de plasma é constituído pela mistura de espécies reativas que se criam e é obtido como resultado de uma série de ionizações ao longo do gás. A proporção obtida entre partículas carregadas positiva e negativamente é tal que, a carga total do gás é considerada, aproximadamente, zero. O plasma torna-se visível devido a emissão de fotões, na zona de ionização, pelas espécies que foram excitadas.

É importante salientar que, como já vem sido dito, alterações nos parâmetros utilizados na produção do plasma podem originar plasmas constituídos por espécies diferentes. Assim, é fundamental determinar que espécies são obtidas no plasma produzido.

Durante este trabalho a técnica utilizada para a caracterização do plasma foi a Espectroscopia Ótica de Emissão.

3.4. Espectroscopia Ótica de Emissão

A determinação das espécies existentes no plasma produzido pode ser feita através da técnica de espectroscopia ótica de emissão. Esta é uma técnica relativamente simples e de baixo custo, capaz de fornecer os resultados sem interferir com o plasma, durante o processo. Apresenta como vantagens adicionais o facto de ter uma rápida resposta, bem como um baixo limite de deteção, o que torna possível a identificação de pequenas densidades de espécies excitadas.

Esta técnica explora o facto de o plasma emitir luz baseando-se na análise dessa luz emitida por átomos neutros e/ou ionizados, radicais ou moléculas. Num espectro de emissão, as linhas de emissão são originadas pelo decaimento de moléculas ou átomos eletronicamente excitados (devido às colisões acima referidas). A existência de determinadas linhas de emissão no espectro permite a identificação, de forma inequívoca, das espécies presentes no plasma, uma vez que, cada linha de emissão é característica de uma espécie em particular.

O princípio de funcionamento desta técnica prende-se na determinação do comprimento de onda da linha spectral através da energia do fotão que é emitido pela espécie excitada. A radiação emitida pelo plasma é coletada e transportada através de uma fibra ótica, *FC-UV600-2* da *Avantes*, até um espectrómetro (SPEC STD, Sarspec). Em todas as medidas realizadas, a gama spectral utilizada foi 180-1100 nm com uma resolução de 1,7 nm e a fibra ótica foi mantida perpendicularmente ao jato de plasma, sensivelmente a 0,5 cm de distância.

Através da análise dos espectros de emissão obtidos foi possível obter a informação das espécies que constituem o plasma produzido, nas diversas condições testadas.

3.5. Ensaios Celulares *in vitro*

A última parte deste trabalho corresponde à realização de testes, de forma a justificar a validação do dispositivo produzido. Para tal, foram realizados testes de viabilidade celular que visam determinar a capacidade das células de manter ou recuperar a sua viabilidade (integridade).

Esta última etapa, de validação do dispositivo, foi realizada através de ensaios *in vitro*, de modo a permitir tirar algumas conclusões prévias e evitar que ensaios *in vivo* sejam realizados desnecessariamente. Embora os seus resultados não possuam, *a priori*, uma relação direta com os ensaios *in vivo*, são um processo fundamental numa fase inicial de qualquer investigação. Assim, sendo os testes *in vitro* muito mais económicos, acessíveis e de fácil realização, foi possível testar diferentes condições ao longo de todo o processo como o número de células a tratar, os tempos de exposição ao plasma, o tempo de incubação após o tratamento, entre outras.

Desse modo, foram efetuados ensaios celulares de exposição ao plasma por diferentes períodos de tempo e, após um determinado período de incubação, foi medida a viabilidade celular. Neste trabalho o teste utilizado para a determinação da viabilidade celular foi o teste enzimático com resazurina, que se encontra explicado na secção 3.5.3.1.

Tendo em conta a revisão bibliográfica acima apresentada, sobre a possibilidade de os ensaios serem realizados quer de forma direta quer de forma indireta (meio tratado), optou-se por efetuar os mesmos pelo segundo método, o indireto, devido à grande vantagem que este método proporciona no tratamento de determinados cancros que, por exposição direta, não são acessíveis.

3.5.1. Preparação dos Ensaios Celulares

Tal como já foi mencionado, o intuito do presente trabalho foi estudar a exequibilidade da aplicação da tecnologia de plasma frio para o tratamento do cancro da pele e, mais especificamente, para as células do carcinoma escamoso. Assim sendo, a linhagem de células cancerígenas utilizada durante os ensaios foi a SCC-15 (do inglês, *Human Squamous Cell Carcinoma*, ATCC® CRL-1623™), e a linhagem de células humanas utilizadas como meio de analogia às células sãs foi a HGF-1 (do inglês, *Human Gingival Fibroblast*, ATCC® CRL-2014™), ambas adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC, LGC standards, Barcelona).

3.5.1.1. Linhagens Celulares

SCC-15: Células do Carcinoma Escamoso

Uma vez que o objetivo do presente estudo consistiu na validação do dispositivo produzido e, consequentemente, da tecnologia de plasma frio para o tratamento do cancro da pele e de forma a que os testes realizados possam de alguma maneira vir a contribuir para a sua validação, escolheu-se esta linhagem celular que corresponde à segunda manifestação mais comum de cancro da pele, apresentando assim uma elevada relevância. A referida linhagem celular, corresponde a células da cavidade oral, mais especificamente da língua, o que levou à escolha da linhagem de HGF-1 como linhagem de células sãs.

HGF-1: Fibroblastos Gengivais Humanos

Os fibroblastos são células que possuem funções vitais tanto durante o crescimento como na vida adulta. Estes constituem o tecido conjuntivo que tem como algumas das suas funções principais a distribuição de células de defesa pelo corpo e o suporte estrutural. Os fibroblastos possuem um papel importante no controlo do crescimento e diferenciação celular e são responsáveis pela produção de proteínas essenciais como o colagénio e a elastina além de outras proteínas que fazem parte da matriz extracelular.

Em geral, os fibroblastos são um dos tipos celulares de mamíferos mais acessíveis e dos mais fáceis de crescer em cultura. Assim sendo, foi escolhido este tipo celular e mais especificamente os fibroblastos gengivais humanos normais, que são os maiores constituintes do tecido gengival e têm um papel fundamental na sua subsistência, uma vez que, tal como citado anteriormente, a linhagem celular cancerígena corresponde à células da cavidade oral [41].

3.5.1.2. Cultura Celular

Ambas as linhagens celulares correspondem a células aderentes e foram incubadas numa câmara apropriada para cultura celular (Sanyo-19AIC), a 37 °C numa atmosfera húmida com 5% CO₂ em frascos de cultura, ventilados, de 75 ou 25 cm² de área de cultura (T75 ou T25, Corning® 430641U ou 431463, respetivamente) sendo o meio de cultura celular mudado frequentemente (com 2 ou 3 dias de intervalo), de forma a garantir a sua sobrevivência e nutrição e permitir o seu crescimento e desenvolvimento.

A linhagem celular HGF-1 foi cultivada com DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, D5648), suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma, 102710), 1% de L-Glutamina (Sigma, G7513) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep, Sigma, A5955). A linhagem SCC-15 foi cultivada com DMEM-F12 (meio conjugado com mistura nutritiva F-12; ATCC® 30-2006™) suplementado com 10% de FBS, 1% de antibiótico e 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma, H0888).

Ambas as linhagens foram mantidas em cultura nas condições supracitadas até atingirem a confluência celular.

3.5.1.3. Preparação dos Ensaios Celulares

De forma a realizar os ensaios celulares foi necessário remover as células dos frascos de cultura, efetuar a sua contagem e colocar o número de células que se pretendia estudar em poços de microplicas de 96 poços. Este processo de preparação das placas foi realizado sempre no dia anterior aos ensaios, de modo a possibilitar que as células aderissem ao fundo da placa (uma vez que são colocadas em suspensão nos poços), durante a noite de incubação, antes do tratamento com o meio tratado.

Contagem das células

Tendo em conta que os ensaios foram efetuados para um número específico de células por poço, foi necessário efetuar a sua contagem. Assim, para a contagem celular, e posterior preparação das placas, foi necessário primeiro descolar as células dos frascos de cultura.

Para “descolá-las”, inicialmente foi removido o meio de cultura que se encontrava no frasco e adicionou-se PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, Sigma) o qual se retirou logo de seguida, tendo-se posteriormente adicionado uma pequena quantidade de *tryple* (Gibco, 12604-021), o suficiente apenas para cobrir todo o fundo do frasco. De seguida, o frasco foi colocado na câmara de incubação por cerca de 5 minutos, de forma a permitir que o *tryple* atuasse e as células descolassem do fundo. Após esse período, o frasco foi visualizado ao microscópio, de modo a garantir que as células se encontravam efetivamente em suspensão (descoladas). Uma vez cumpridas todas estas fases, adicionou-se ao frasco uma quantidade pequena (1/2 mL) do meio respetivo para neutralizar o efeito do *tryple*. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para um tubo *falcon* esterilizado.

Para a determinação da concentração de células na suspensão celular, foi utilizada a técnica da câmara de Neubauer, que permite obter uma estimativa do número de células através de

uma contagem ao microscópio. A câmara de Neubauer corresponde a uma lâmina espessa de uso microscópico, retangular e normalmente, de vidro, com duas depressões ao centro (Figura 3.5 – Entrada de suspensão) onde é colocada a mistura cuja concentração se pretende determinar (Figura 3.5). Para se efetuar a contagem, foi preparada num tubo *ependorf* estéril uma pequena mistura, 1:1 (100 μ L:100 μ L), da suspensão, anteriormente, colocada no *falcon* e do corante *trypan blue* (Sigma, T8154), responsável por “sinalizar” os núcleos das células e torná-las facilmente quantificadas ao microscópio, tal como se mostra na Figura 3.6.

Posteriormente, um pequeno volume da mistura com o corante (o suficiente para preencher as entradas) foi pipetado e colocado nas entradas de suspensão da lâmina (Figura 3.5) tendo sido, de seguida, efetuada a contagem ao microscópio. Através dessa contagem obtém-se uma estimativa do número de células presentes por mL da suspensão preparada tornando assim possível, tendo em conta o número de células a utilizar no ensaio, calcular o volume necessário de cada suspensão celular.

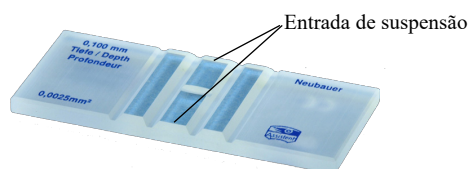


Figura 3.5. Câmara de Neubauer utilizada para a quantificação da suspensão celular.

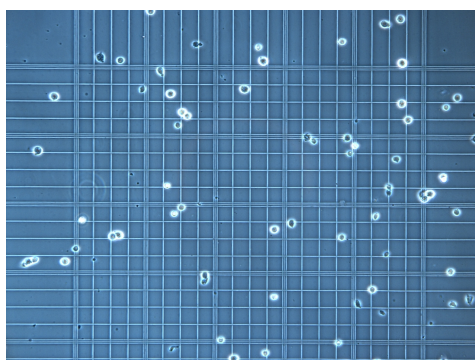


Figura 3.6. Leitura da câmara de Neubauer obtida ao microscópico após adição do *trypan blue* à suspensão celular.

Preparação das placas

Posteriormente, o volume de suspensão celular necessário foi pipetado para as placas de 96 poços e, de seguida, foi adicionado meio, de modo a perfazer 150 μ L por poço (Figura 3.7.).

As placas foram deixadas em cultura durante cerca de 20/24h, de forma a permitir, tal como já foi referido, que as células adiram ao fundo da placa. É importante que o período entre a preparação das placas e a realização dos ensaios não exceda as 20/24 h. Isto porque, uma vez que se pretende efetuar os testes com um número específico de células por poço, quanto maior o período de espera, menor é a garantia de que no poço permanece o número de células estimado visto que estas, tal como se sabe, possuem um crescimento e replicação celular constante.

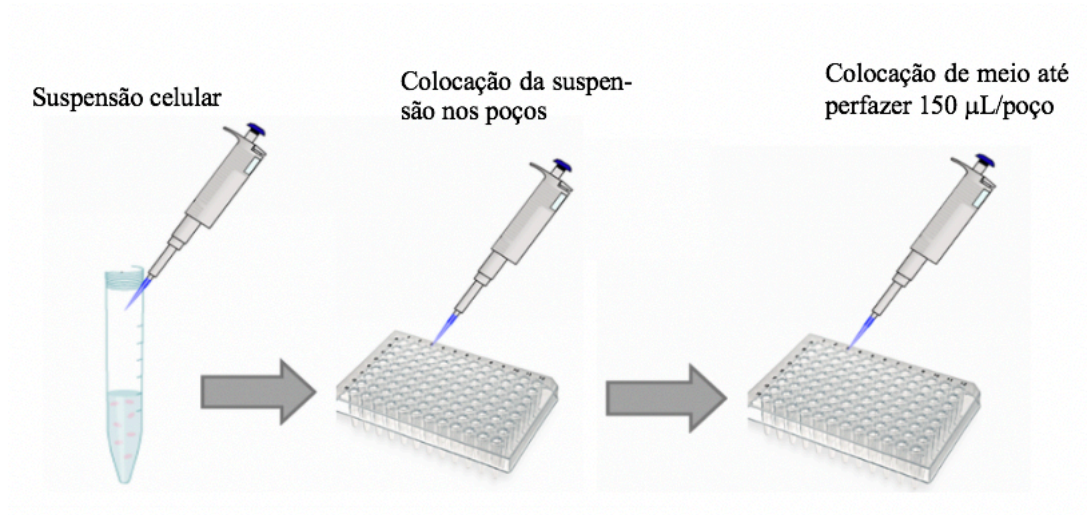


Figura 3.7. Preparação das placas de 96 poços. Transferência da quantidade de suspensão celular pretendida para os poços e posterior adição de meio de forma a perfazer os 150 µL por poço.

3.5.2. Tratamentos Celulares

No tratamento de plasma de forma indireta, a fonte de plasma irradia verticalmente uma dada quantidade de meio celular que foi previamente pipetado para os diferentes poços de uma microplaca de 12 poços.

Durante a exposição, o árgon flui pelo tubo até chegar à sua extremidade inferior onde ocorre a sua ignição e consequente formação do plasma. A interação do plasma (suas espécies constituintes) com o ar ambiente e com o meio celular vai desencadear uma série de reações e originar a produção de espécies reativas que, posteriormente, aquando da transferência desse meio tratado para as células, irá provocar alterações na sua viabilidade através de processos diversos. A toxicidade do jato de plasma está dependente da quantidade de espécies (particularmente, da quantidade de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), RNS e ROS) que vão ser produzidas durante o tempo em que o meio está exposto ao jato de plasma. Por sua vez, esta quantidade de espécies

geradas é dependente do tempo de exposição e da quantidade de meio que está a ser submetido ao plasma [42].

Tendo em conta todos estes fatores que levam a alterações nos resultados finais, foi necessário efetuar testes preliminares para diversas combinações de parâmetros, de forma a que se pudesse verificar as suas relações e, assim, determinar as condições mais adequadas para obter os resultados pretendidos.

Desta forma, com o intuito de determinar as condições que originam os resultados mais promissores, os tratamentos foram realizados alternando as seguintes condições: volumes de meio a tratar (1 e 2 mL), diferentes tempos de exposição ao CAP (entre os 2,5 e os 9 minutos), diferentes números de células por poço (foram feitos testes para 2×10^4 , 2×10^3 e $3,5 \times 10^3$ células por poço) e variação do volume de meio tratado que é posteriormente transferido para as células (100 ou 150 μ L). A Tabela 3.1. sumaria as diversas condições testadas.

Tabela 3.1. Representação das várias condições testadas para diferentes tempos de exposição celular.

Linhagem Celular	Nº de células/poço	Volume de meio Tratado (mL)	Volume transferido pós tratamento (μ L)
HGF-1 / SCC-15	2×10^4	2	100
			150
		1	100
			150
	$3,5 \times 10^3$	2	100
			150
		1	100
			150
	2×10^3	2	100
			150
		1	100
			150

Ultimamente, têm sido efetuados diversos estudos no âmbito de examinar a influência do piruvato (substância presente no meio de cultura, DMEM completo) nas células. Os resultados reportados na literatura têm vindo a apontar para a influência do piruvato na proteção celular e na inibição dos efeitos provocados pelo H_2O_2 [43]. Neste contexto, decidiu-se realizar os ensaios com DMEM sem piruvato, de modo a garantir que as reduções observadas na viabilidade celular, resultam do efeito da exposição ao jato de plasma e das interações daí resultantes. Assim, o meio que foi colocado nos poços das microplacas de 12 poços para ser exposto ao CAP não foi o meio normal de cultura (DMEM completo) mas, um meio previamente preparado sem o piruvato na sua composição (DMEM sem piruvato).

Os testes foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar que foi previamente esterilizada por uma lâmpada ultravioleta, de forma a garantir que se reuniam todas as condições para a realização dos ensaios. Todos os ensaios foram efetuados com um fluxo de árgon (99% de pureza, Air Liquide) de 3 slm (do inglês, *standard liters per minute*) controlado por um fluxímetro (Dynamal Argon 0-15 l/min, Air Liquide).

Durante todos os ensaios foram mantidas constantes as posições dos elétrodos, bem como a do tubo de borossilicato em relação aos poços da microplaca, de forma a assegurar que os testes eram todos realizados nas mesmas condições, tornando assim os seus resultados comparáveis.

As posições e distâncias utilizadas durante todo o trabalho foram as seguintes:

- i. elétrodo interno (agulha) a 1 mm da extremidade do tubo de borossilicato;
- ii. elétrodo externo a 2 mm do fim do tubo de borossilicato;
- iii. tubo de borossilicato a 2 mm do topo do poço da placa.

A distância entre o tubo e os poços foi escolhida após a realização de ensaios anteriores onde se fez variar esse valor, de forma a ser possível concluir qual o *gap* (distância entre a extremidade do tubo de borossilicato e o topo do poço) que produzia resultados mais significativos/efetivos no presente trabalho (dados não apresentados).

Após o tratamento, o meio colocado nas placas de 96 poços para a adesão celular, durante a noite anterior, foi removido e as células que, entretanto, aderiram aos poços, foram de seguida lavadas com PBS sem cálcio e magnésio na sua composição. O PBS corresponde a uma solução tampão funcionando, neste caso, como meio de limpeza celular. Posteriormente, foram então transferidos 100 ou 150 μL do meio tratado para os poços com as células previamente cultivadas (Figura 3.8).

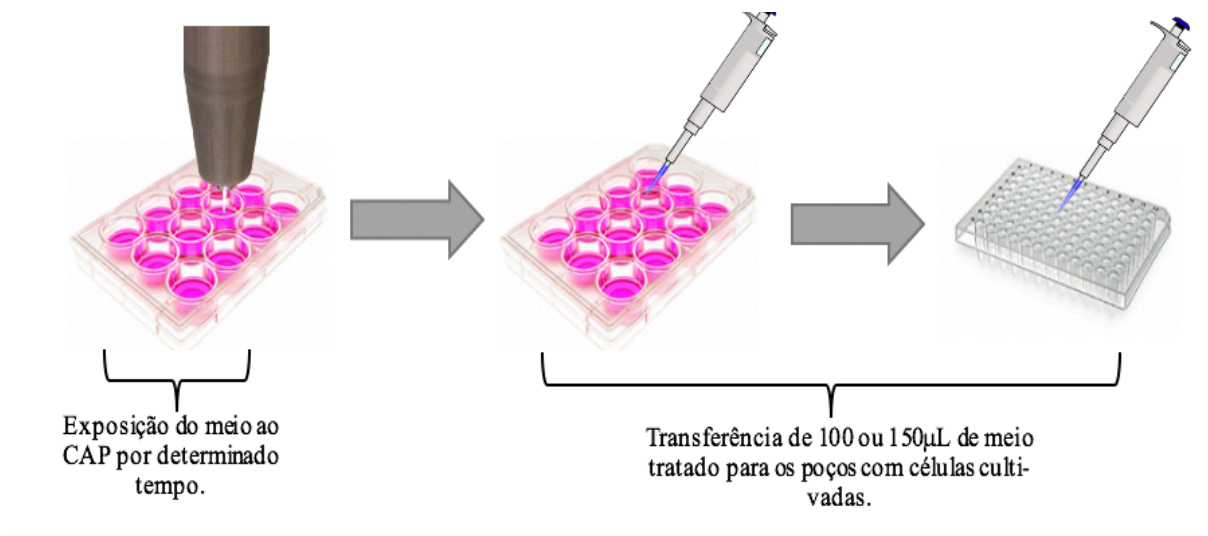


Figura 3.8. Processo de tratamento do meio celular pelo CAP. O meio é exposto ao CAP e, de seguida, 100 ou 150 μ L de meio tratado são transferidos para os poços onde as células se encontram (HGF-1 e SCC-15).

As placas foram divididas nas várias condições utilizadas, sendo necessário haver sempre uma coluna de células com meio não tratado, de modo a funcionar como controlo para posterior estudo da viabilidade relativa.

De forma a facilitar o entendimento do procedimento, nas Figuras 3.9 e 3.10, é possível visualizar como a placa foi dividida em alguns dos ensaios.

Após a transferência do meio tratado para todos os poços, as células foram novamente colocadas a incubar nas mesmas condições (37° C, 5% CO₂) durante 48 h, para posterior realização dos testes de viabilidade.

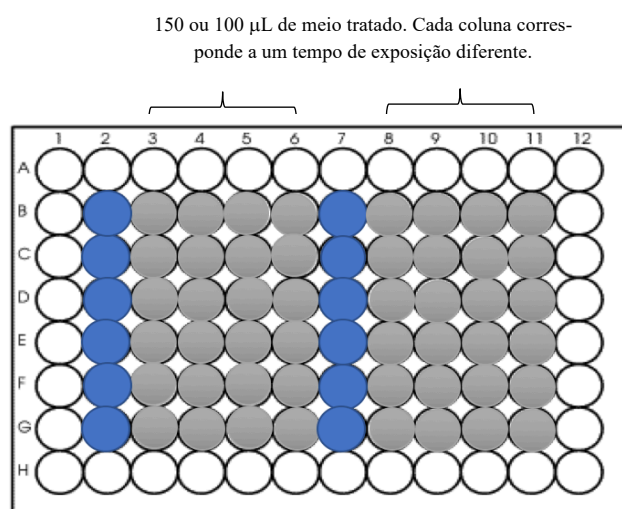


Figura 3.9. Divisão de cada placa (HGF-1, SCC-15) consoante as variantes a estudar: número de células, tempos de tratamento, quantidade de meio tratado a transferir e quantidade de meio a tratar. Colunas 2-6 e 7-11 possuem números de células diferentes. Colunas 2 e 7 correspondem aos controlos (células + meio não tratado) para diferentes números de células cada. O objetivo, neste caso, é estudar a relevância do número de células por poço.

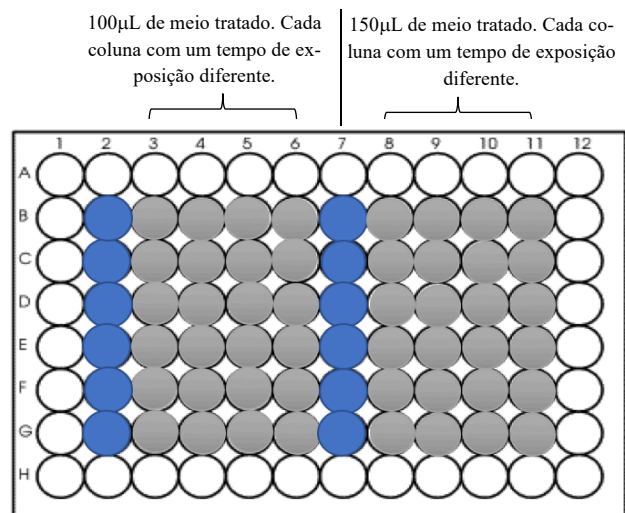


Figura 3.10. Divisão de cada placa (HGF-1, SCC-15) consoante as variantes a estudar: número de células, tempos de tratamento, quantidade de meio tratado a transferir e quantidade de meio a tratar. Colunas 2 e 7 correspondem aos controlos (células + meio não tratado) para diferentes volumes de meio tratado transferido (150 ou 100 μL). A placa possui o mesmo número de células em todos os poços. O objetivo, neste caso, é estudar o efeito do volume de meio tratado transferido.

3.5.3. Teste de Viabilidade Celular

3.5.3.1. Ensaio de Resazurina

O efeito da exposição ao jato de plasma na viabilidade celular foi adquirido através da medida da atividade metabólica total resultante. Após o tempo de incubação foram efetuados testes de viabilidade celular, de forma a determinar a percentagem de células (cancerígenas ou saudáveis) que se mantém viável após o tratamento com o meio submetido ao CAP. O teste de viabilidade celular utilizado foi o ensaio de redução da resazurina, um teste relativamente rápido, barato, simples e com elevada sensibilidade.

A resazurina é um indicador celular de oxidação-redução que pode ser utilizado para monitorizar a viabilidade celular através de processos metabólicos, da atividade enzimática celular. O teste é baseado na habilidade da enzima desidrogenase, que se encontra presente nas células metabolicamente ativas, reduzir a resazurina (corante azul) em resofurina (corante rosa/vermelho), tal como indicado na Figura 3.11. O corante, de coloração azul, é captado pelas células e

enzimaticamente reduzido originando uma alteração na coloração para o rosa/vermelho [44]. A quantidade de resofurina que é produzida é proporcional ao número de células viáveis (ativas) o que, posteriormente, pode ser facilmente quantificado utilizando um leitor de microplacas através da medição de alterações na absorvância para determinados comprimentos de onda. O presente ensaio exige um tempo de incubação entre 1 a 4 h (dependendo da atividade enzimática da linhagem celular em utilização) após a sua colocação (da resazurina) nos poços das microplacas, para que a reação de redução possa ocorrer.

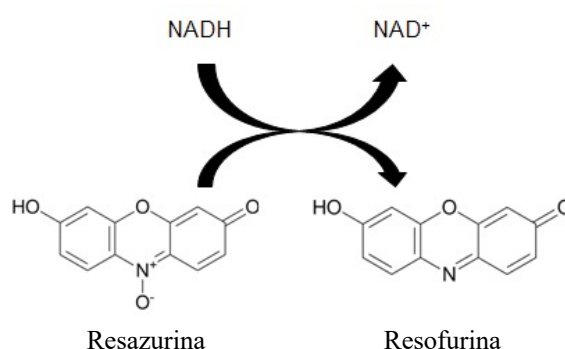


Figura 3.11. Princípio de redução da resazurina em resofurina. Adaptado de [44].

3.5.3.2. Leitura da Viabilidade

Desse modo, para a realização do teste, o meio tratado que se encontrava nos poços foi retirado na totalidade (apenas as células permaneceram nos poços) e, de seguida, foi efetuada uma mistura de DMEM sem piruvato com o corante, resazurina, (50% de cada) sendo colocados 150 μ L da mistura preparada em todos os poços em utilização na microplaca. Adicionalmente, foram igualmente colocados 150 μ L da mistura anteriormente referida em 3 ou 4 poços da microplaca que não haviam sido utilizados de forma a que, no momento da análise dos resultados da leitura, se pudesse retirar aos valores medidos a contribuição do corante (Figura 3.12.).

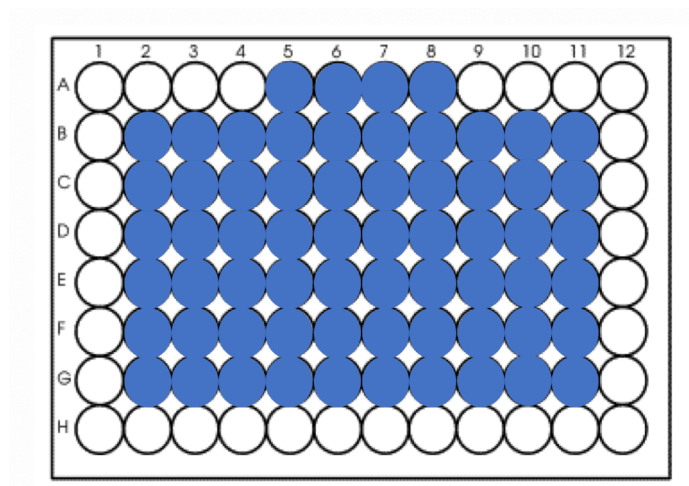


Figura 3.12. Preparação da placa para posterior leitura da viabilidade. A primeira fila não contém células, é colocada a mistura de meio com resazurina para funcionar como controle do reagente e ser, posteriormente, retirado aos restantes poços no momento da análise.

De seguida, a placa foi colocada a incubar no escuro, sob as condições já citadas, durante aproximadamente 4 horas, tempo suficiente para que as células consigam metabolizar e, consequentemente, originar a alteração de cor dependendo da sua viabilidade (Figura 3.13.).

Posteriormente, a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 570 nm e a uma referência de 600 nm através de um leitor de microplacas (BioTek Instruments, ELx800), [45].

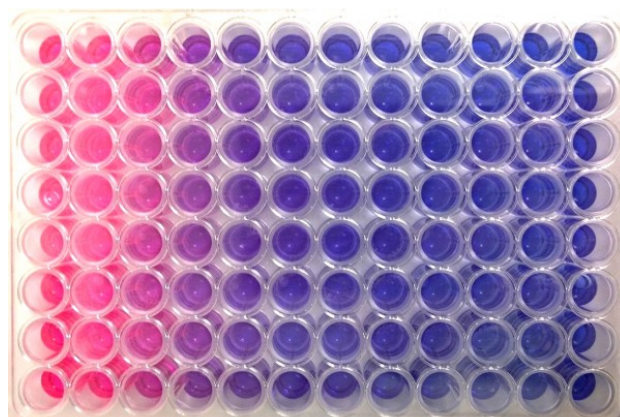


Figura 3.13. Imagem ilustrativa de uma microplaca de 96 poços após o tempo de incubação. Da esquerda para a direita verifica-se uma diminuição da viabilidade relativa, menor atividade metabólica. Quanto mais rosa for, maior a capacidade de redução da resazurina (azul) em resofurina (rosa) e, consequentemente, maior viabilidade relativa.

Todo o procedimento celular acima citado foi realizado no laboratório de Engenharia de Tecidos da Faculdade de Ciência e Tecnologia, que se encontra devidamente equipado e preparado para uma boa prática dos processos. Os processos foram executados numa câmara de fluxo laminar e o equipamento usado foi todo previamente esterilizado e desinfetado com isopropanol cumprindo assim as exigências que estas tarefas acarretam, de forma a evitar contaminações ou outras complicações, que possam diminuir a confiança nos resultados obtidos.

3.6. Análise Estatística

Todos os ensaios de viabilidade celular foram realizados, no mínimo, três vezes de forma independente e com cada variante em sextuplicado, com o intuito de verificar a fiabilidade dos resultados obtidos.

Os resultados encontram-se expressos, no Capítulo V, como a média \pm o desvio padrão dos resultados obtidos para, no mínimo, os três ensaios realizados independentemente.

O teste *t-student* foi utilizado para avaliar, estatisticamente, as significâncias das diferenças obtidas entre os diferentes testes para todas as condições experimentais testadas. As significâncias calculadas encontram-se representadas pelo *p-value* como, *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

4. Desenvolvimento dos Dispositivos

Neste capítulo são apresentados os dispositivos que foram produzidos, nomeadamente a fonte de alta tensão e a “caneta” de plasma. Ao nível da fonte, são apresentados os diagramas do circuito, bem como a explicação sucinta do seu modo de funcionamento e os resultados obtidos após a sua construção. Ao nível do dispositivo de plasma em si, é apresentado não só o resultado final que valida o dispositivo desenvolvido, como são referidas as diferentes configurações e variantes que foram experimentadas e testadas até se alcançar o dispositivo final.

4.1. Fonte de Alimentação do Plasma

A fonte de alimentação do plasma utilizada para estabelecimento da descarga do plasma tem por base o esquema geral ilustrado na Figura 3.1 (Capítulo III) e é constituído pelos seguintes blocos principais: fonte de tensão DC, circuito oscilador de amplitude variável, transformador de linhas e retificador.

A fonte de tensão DC foi dimensionada de modo a fornecer uma tensão de saída, contínua, ajustável entre os 1,25 e os 20 V, que vai alimentar um circuito oscilador (ZVS) que gera um sinal AC que, posteriormente, é amplificado por um transformador de linhas (ou *flyback*). Uma vez que o sinal fornecido pelo ZVS é alternado, AC, o transformador de linhas possui acoplado à saída um retificador, correspondente a um diodo, de modo a efetuar a conversão do sinal AC – DC.

Adicionalmente, tendo em conta que o circuito oscilador responsável pelo sinal AC que alimenta o transformador de linhas necessita de corrente elevada, para elevar a tensão até aos valores pretendidos, da ordem de 20 kV, 20 mA, foi necessário dimensionar a fonte de tensão de modo a suportar uma corrente de 15 A.

4.1.1. Fonte de Tensão DC

A fonte de tensão DC é constituída por um transformador monofásico, alimentado à rede, com uma tensão de saída única de 30 V AC e corrente até 15 A.

De seguida, o sinal alternado obtido à saída do transformador passa por uma ponte retificadora (ponte de díodos) onde é efetuada a retificação de onda completa do sinal, tal como ilustrado na Figura 4.1, [46].

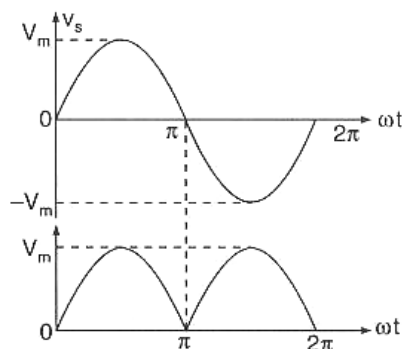


Figura 4.1. Retificação de onda completa: em cima o sinal alternado obtido à saída do transformador e em baixo o sinal após passar pela ponte de díodos. O sinal passa a ter apenas componente positiva [46].

Após a retificação, o sinal passa por quatro condensadores de 4700 μF ligados em paralelo, totalizando 18 800 μF , e que são responsáveis pela filtragem do sinal e consequentemente, pela obtenção do sinal DC. No entanto, e à semelhança do que se verifica na maioria dos conversores AC – DC, o sinal obtido à saída dos condensadores não é uma linha perfeitamente contínua e horizontal, apresentando algum *ripple*, tal como se encontra demonstrado na Figura 4.2. O *ripple*, também designado por tensão de ondulação, é obtido como resultado da carga e descarga dos condensadores.

Como a descarga do condensador é muito mais lenta que a sua carga, o resultado final da filtragem é uma tensão que pode ser considerada como contínua.

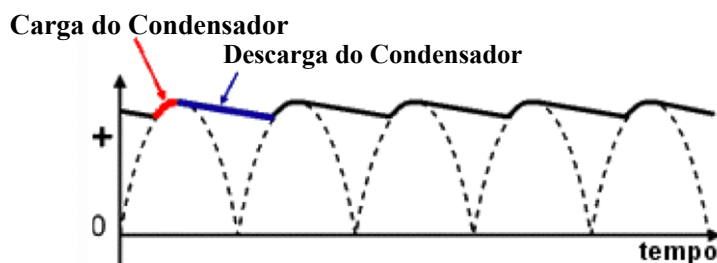


Figura 4.2. Sinal à saída dos condensadores. É possível comprovar que a carga do condensador é mais rápida do que a sua descarga, o que possibilita a obtenção de um sinal praticamente constante. Adaptado de [46].

Para que seja possível variar a tensão a partir da que se obtém à saída (aproximadamente os 42 V de tensão eficaz fornecidos pelo transformador), foi utilizado o circuito regulador integrado LM317 que permite uma variação da tensão de saída dos 1,25 aos 37 V [47].

4.1.1.1. LM317

O LM317 é um circuito integrado que permite regular e fazer variar, de forma linear, uma tensão contínua dentro de uma gama máxima definida, dos 1,25 aos 37 V, através da manipulação de uma resistência fixa e de um potenciómetro (R_1 e R_2 , respetivamente), tal como representado na Figura 4.3.

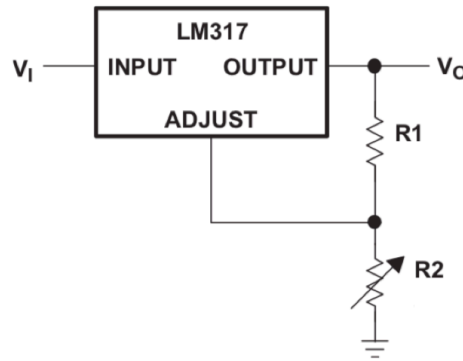


Figura 4.3. Circuito do LM317 para regulação da tensão. O circuito apresenta três pinos: adjacente (*adjust*), o pino de entrada (*input*, V_i) e o de saída (*output*, V_o). R_1 e R_2 são responsáveis por regular a tensão de saída. Adaptado de [47].

Uma das características do circuito integrado acima representado, prende-se com o facto de que, em condições normais, a tensão entre o pino adjacente e o de saída ser igual a 1,25 V.

Assim, a tensão à saída no circuito integrado é igual à tensão no pino de saída, V_o , mais 1,25 V ou, em alternativa, pode ser calculada por:

$$V_o = 1,25 \text{ V} \times \left(1 + \frac{R_2}{R_1} \right). \quad (4.1)$$

onde, V_o corresponde à tensão de saída resultante, e R_2 e R_1 correspondem as resistências variável e fixa, respetivamente, que são manipuladas de acordo com a gama de tensão de saída pretendida.

Desse modo, a tensão mínima possível de ser obtida corresponde a 1,25 V, que diz respeito ao caso particular em que a resistência variável, R_2 , se encontra na posição mínima, 0 Ω .

Tendo em conta o intervalo de tensões que se pretende obter com a fonte de alimentação, o dimensionamento foi realizado para $R_1 = 270 \, \Omega$ e $R_2 = 5 \, k\Omega$, obtendo-se assim uma tensão à saída do circuito integrado entre os 1,25 e 24 V.

Uma vez dimensionado o circuito responsável por regular a tensão de saída a partir do sinal de entrada (sinal à saída dos condensadores) e tendo em conta que o LM317 suporta uma corrente máxima de 1,5 A, foi necessário efetuar uma adaptação de modo a que o circuito suportasse os 15 A necessários. Para tal, foram adicionados ao circuito quatro transístores de potência (2N3055) em paralelo, dividindo assim por cada um a corrente total a percorrer o circuito e, consequentemente, garantindo que ao regulador integrado LM317 não chega corrente acima da sua capacidade máxima.

O esquema final da fonte de tensão DC implementada encontra-se representado na Figura 4.4. Foram adicionadas resistências aos emissores dos transístores de forma a torná-los intrinsecamente iguais. É importante salientar que o dimensionamento da fonte de tensão DC, regulada a partir do regulador integrado LM317, foi feito para 24 V e não para os 20 V que foram referidos anteriormente, de forma a ter em conta as perdas que inevitavelmente ocorrem ao longo do circuito e que o circuito, quando testado “no vazio”, fornece valores de saída mais elevados do que no momento em que se adiciona carga (neste caso será adicionado o oscilador e o transformador *flyback*).

Tanto os transístores como o regulador integrado LM317 foram montados em dissipadores, de modo a aumentar a dissipação do calor produzido pelos componentes e assim evitar que o seu inevitável sobreaquecimento venha danificar o circuito integrado em causa.

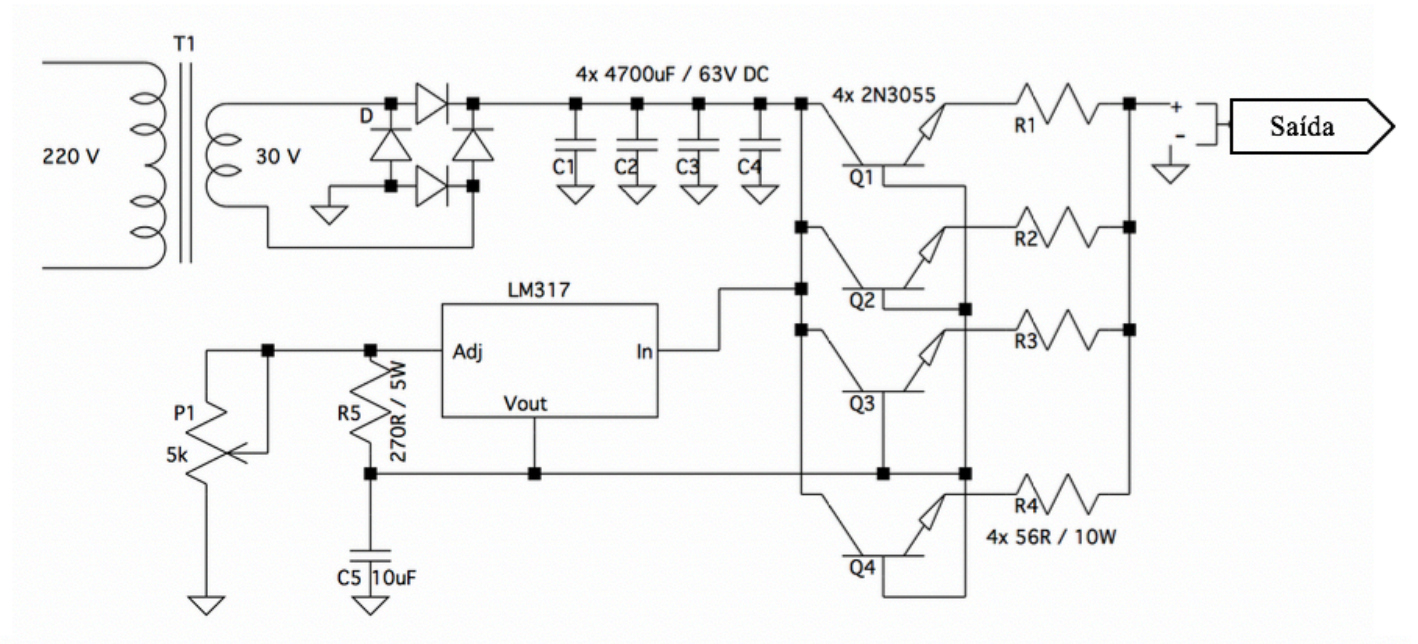


Figura 4.4. Diagrama da fonte de tensão DC. A fonte de tensão tem como objetivo produzir uma tensão DC variável, de forma a posteriormente ligar-se ao circuito oscilador e transformador de linhas e produzir a alta tensão.

4.1.2. Circuito oscilador de amplitude variável e transformador *flyback*

O circuito oscilador, ou ZVS, é responsável por “conduzir” o transformador de linhas. A sua função consiste, basicamente, em fornecer ao *flyback* um sinal de entrada pulsado de alta frequência permitindo, assim, que o mesmo funcione.

Atualmente, este é o “condutor” mais eficiente já alguma vez feito, podendo ser dimensionado para operar até 1000 W e com uma eficiência até 90% [47].

O esquema do circuito oscilador executado encontra-se representado na Figura 4.5. De uma forma geral, quando uma tensão é aplicada no ponto +V, a corrente flui através das resistências de $470\ \Omega$ até ambos os MOSFETs (do inglês, *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*, IRFP250N, Figura 4.6) [49]. As resistências referidas servem para limitar a corrente que vai carregar a *gate* (G) evitando que o MOSFET seja danificado.

De seguida, como os componentes nunca são perfeitamente iguais, um dos MOSFET é ativado primeiro permitindo que mais corrente o percorra. Consequentemente, a corrente que percorre a *gate* do MOSFET não ativo é consumida pelo MOSFET que foi ativado e o diodo (D_1 ou D_2) bloqueia a *gate* do outro MOSFET.

Tendo em conta que o circuito possui os condensadores em paralelo com a bobina, tem-se um circuito ressonante que será responsável por fazer com que o *drain* (D) do MOSFET inativo alcance os 0 V. Os condensadores, por sua vez, são responsáveis por fazer a tensão variar sinusoidalmente impedindo que a corrente aumente constantemente até saturar e, consequentemente, danificar os MOSFETs.

De seguida, uma vez atingidos os 0 V, a *gate* do MOSFET que anteriormente estava ativo começa a descarregar através do diodo (D_1 ou D_2) que se encontra ligado ao *drain* do MOSFET oposto, desligando assim o primeiro MOSFET. Uma vez desligado o primeiro MOSFET, o segundo é ativado e o ciclo repete-se.

Este tipo de circuitos é comumente designado por ZVS, *zero-voltage switching*, uma vez que a comutação entre os MOSFETs ocorre quando o que estava ativo atinge os 0 V, isto é, quando a tensão entre os terminais é zero. Este tipo de funcionamento torna o gasto de energia por transferência de calor muito menor tornando o sistema mais eficiente.

Os diodos de zener (D_3 e D_4) funcionam como sistema de proteção dos MOSFETs garantindo que a tensão da G não é superior a 12 V (tensão dos diodos utilizados). Por sua vez, as resistências de 10 k Ω servem para eliminar qualquer excesso de carga na *gate* do MOSFET (funcionando como condensadores). A bobina central (L_1) serve para proteger o circuito de picos de corrente que o podem danificar.

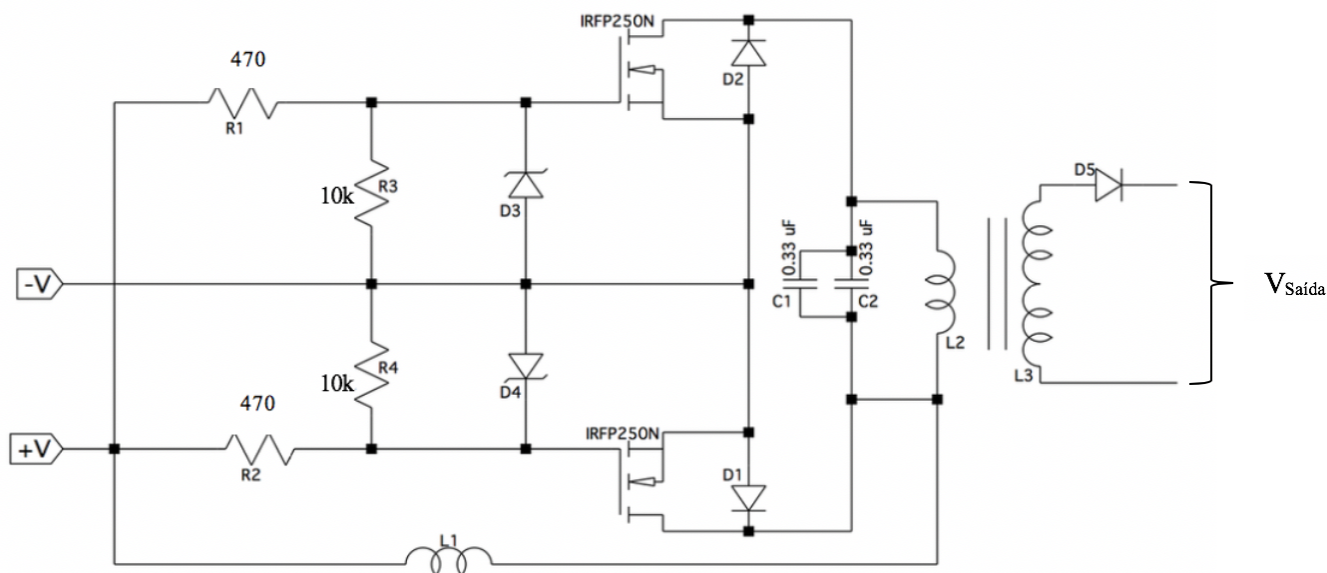


Figura 4.5. Diagrama do circuito oscilador e do transformador de linhas (representado por L_2 e L_3). O circuito é ligado diretamente ao flyback e é responsável pelo seu funcionamento.

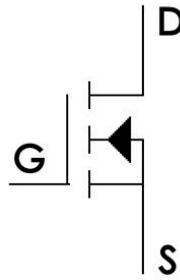


Figura 4.6. Representação esquemática do MOSFET utilizado no circuito ZVS, IRFP250N. Ilustração da designação dos terminais do MOSFET de forma a facilitar o entendimento do circuito: o *drain* (D), a *gate* (G) e a *source* (S). Adaptado de [49].

Cálculo da frequência de oscilação do ZVS

Tal como referido, o ZVS fornece ao *flyback* um sinal de entrada com elevada frequência de oscilação. Dado que este circuito diz respeito a oscilador ressonante, a sua frequência de oscilação é determinada pelos condensadores ($C_1 + C_2$, pois estão em paralelo) e pela indutância da bobina central (L_1) e é dada por:

$$f = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}. \quad (4.2)$$

onde, L representa a indutância da bobina central L_1 e C a capacidade equivalente dos condensadores C_1 e C_2 . Desse modo, obteve-se para $L = 47 \mu\text{H}$ e $C = 0,66 \mu\text{F}$, uma frequência de oscilação de, aproximadamente, 25 kHz.

Assim, resumidamente, o circuito ZVS vai oscilar a corrente através de L_1 em torno do núcleo do *flyback* com uma frequência de oscilação a volta dos 25 kHz. Esta mudança constante da direção da corrente que ocorre no ZVS, vai criar um campo magnético variável no tempo e induzir uma corrente aos enrolamentos na bobina secundária do *flyback*.

Como já foi referido, os enrolamentos do transformador de linhas têm uma elevada proporção (1:1000) fazendo com que a tensão à saída seja bastante mais elevada, Figura 4.7. O enrolamento do primário do transformador foi feito de modo a que este possua 6 voltas de cada lado, obtendo-se à saída do secundário uma tensão 10^3 vezes maior que a de entrada.

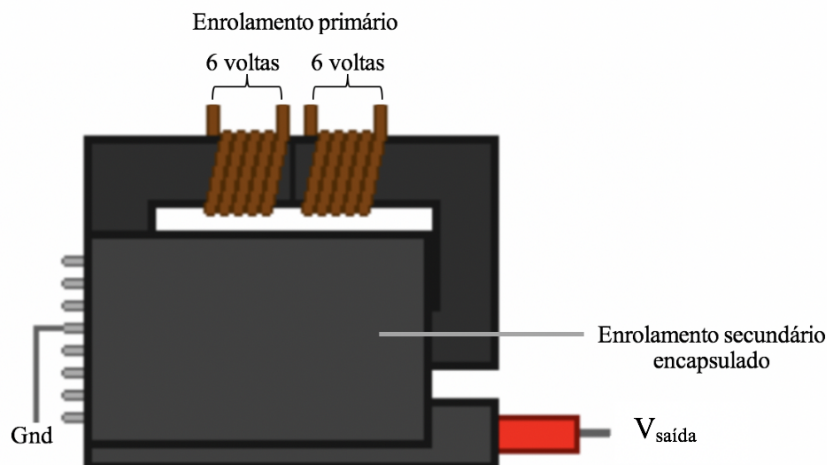


Figura 4.7. Representação esquemática do transformador de linhas. Ilustração dos pinos *ground* e *Vsaída* (alta tensão), e do enrolamento primário efetuado com 6 voltas para cada lado. Adaptado de [48].

Uma vez conectadas todas as partes da fonte de alimentação, obteve-se para valores de saída da fonte de tensão DC entre os 1,5 e 20 V, uma tensão de saída variável até 20 kV, tal como pretendido. Na Tabela 4.1 é possível analisar os valores que foram obtidos à saída do transformador de linhas (saída de alta tensão), quando no potenciômetro se fez variar a tensão da fonte de alimentação. Uma vez que se trata de alta tensão, foi necessário dimensionar um divisor de tensão de fator 1000 para que se pudesse ler os valores obtidos à saída.

Tabela 4.1. Representação da tensão de saída da fonte de alta tensão em função da tensão variável na fonte de tensão DC (tensão de alimentação).

Tensão de Alimentação (V)	Tensão de Saída (kV)
5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1
6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1
7,7 ± 0,1	7,6 ± 0,1
8,0 ± 0,1	8,2 ± 0,1
12,7 ± 0,1	13,0 ± 0,1
14,0 ± 0,1	14,4 ± 0,1
15,2 ± 0,1	15,6 ± 0,1
16,0 ± 0,1	16,4 ± 0,1
17,7 ± 0,1	18,2 ± 0,1
19,0 ± 0,1	19,4 ± 0,1
19,5 ± 0,1	20,0 ± 0,1

Através da análise da Figura 4.8, é possível verificar a existência de linearidade entre as tensões de entrada e de saída que foram obtidas. Adicionalmente, verificou-se que o oscilador ZVS apenas era ativado a partir de uma tensão na fonte de alimentação de, aproximadamente, 5 V. Quer por análise da Tabela 4.1 quer da Figura 4.8, é possível validar não só a existência da linearidade como comprovar que a proporção entre os enrolamentos primário e secundário é efetivamente de 1:1000 (e.g. com uma tensão à entrada de 15 V obtém-se à saída 15 000 V).

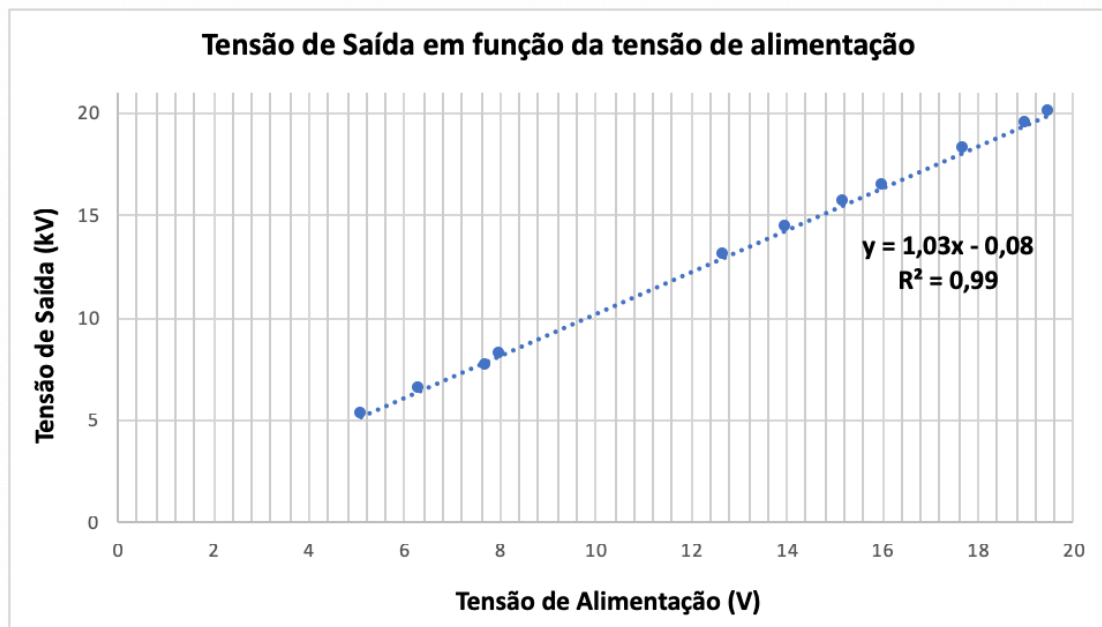


Figura 4.8. Gráfico da tensão resultante da fornecida pela fonte de tensão DC ao resto do circuito da fonte a alta tensão. Eixo das abcissas - Variação da tensão da fonte de alimentação através do potenciômetro (V); Eixo das ordenadas – Tensão obtida à saída do transformado de linhas (kV). Linha de tendência a tracejado para facilitar a visualização. Incerteza associada encontra-se representada através de barras de erro, no entanto, devido a sua dimensão relativamente à escala do gráfico é impossível a sua visualização.

4.2. Caneta de Jato de Plasma

Tal como citado, o desenvolvimento do dispositivo foi baseado no esquema da Figura 3.2, apresentado na secção 3.2, sendo constituído por: tubo exterior (neste caso de borossilicato), entrada para o argon e dois elétrodos metálicos - uma agulha metálica, no interior, e, no exterior do tubo, um anel metálico.

Na Figura 4.9, a) e b), encontra-se ilustrado o esquema e a montagem, respetivamente, efetuadas de modo a poderem ser facilmente testadas algumas variantes na configuração do dispositivo.

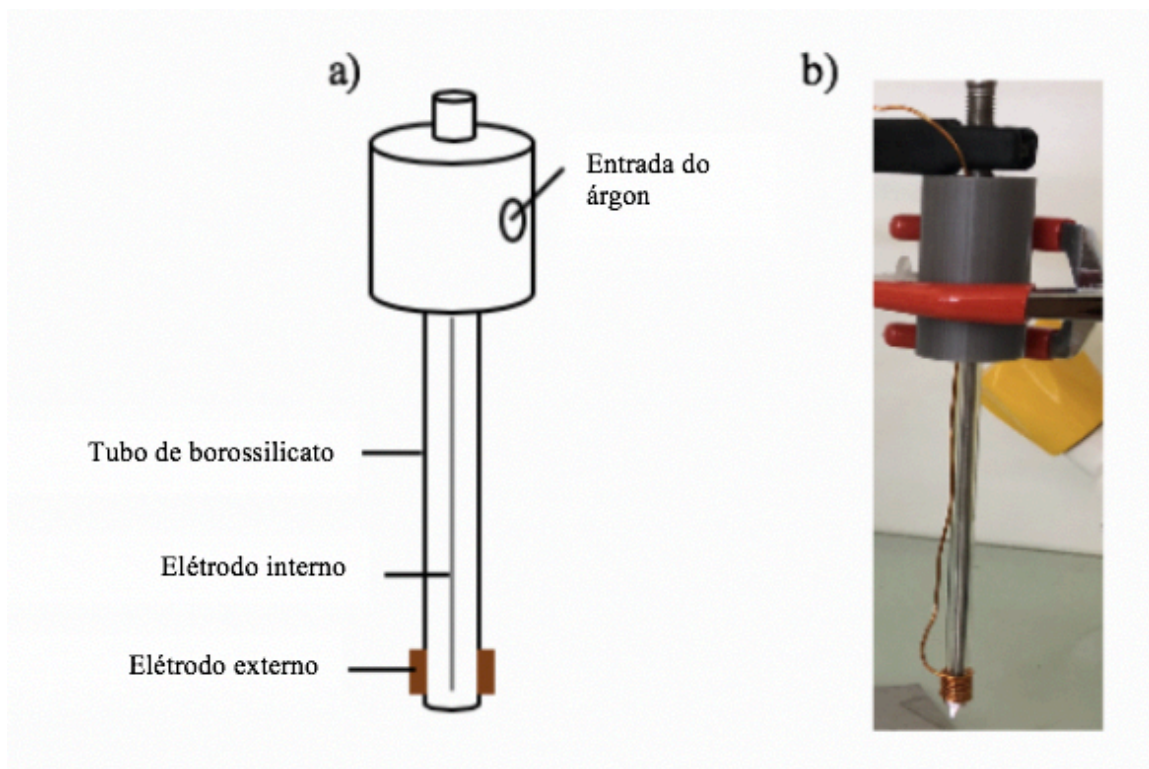


Figura 4.9. Ilustração do Setup experimental utilizado para testar diferentes configurações (e.g. elétrodos diferentes): a) esquema da montagem realizada; b) montagem realizada de forma a facilitar o teste de diferentes configurações.

➤ Configuração do tubo

Ao nível do tubo de confinamento foram testadas duas configurações diferentes com o intuito de verificar se de algum modo a configuração do tubo podia influenciar e, assim, alterar o jato de plasma. Desse modo, o dispositivo foi testado tanto com um tubo cilíndrico como com um tubo afunilado na extremidade inferior (Figura 4.10 (a) e (b)).

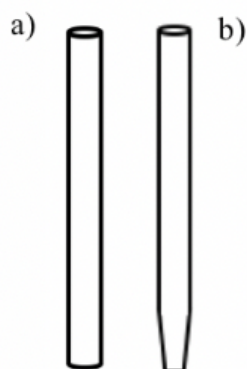


Figura 4.10. Ilustração das configurações testadas para o tubo de confinamento. Ambos os tubos correspondem a tubos de borossilicato.

Em termos de resultados, não se conseguiu obter a formação do plasma com o tubo afunilado, tendo sido essa opção descartada e utilizado o tubo cilíndrico normal.

Assim, o tubo de confinamento escolhido consiste num tubo de borossilicato, caracterizado por ser um material resistente ao calor e aos elementos químicos e por possuir um baixo coeficiente de dilatação; o tubo utilizado tem as seguintes dimensões: 6,97 e 3,76 mm de diâmetro externo e interno, respetivamente, e 13 cm de altura.

➤ Tipo e configuração dos eléctrodos

Ao nível dos eléctrodos, como eléctrodo interno foi utilizada uma agulha de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro. Em termos do eléctrodo externo foram testadas algumas alternativas como a utilização de um anel de cobre ou de titânio ou a elaboração de um eléctrodo a partir de um fio de cobre esmaltado, Figura 4.11 a), b) e c), respetivamente.

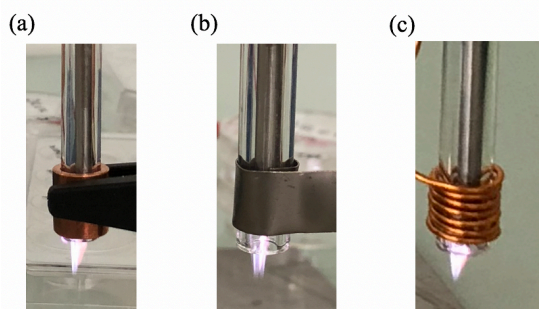


Figura 4.11. Jato de plasma obtido para diferentes eléctrodos: (a) eléctrodo feito através de varão de cobre; (b) eléctrodo feito a partir de uma folha de titânio; (c) eléctrodo feito através de um fio de cobre esmaltado. As imagens não se encontram representadas à mesma escala.

Por análise da estabilidade do jato que era obtido para cada um dos eléctrodos externos, bem como dos resultados obtidos em tratamentos com o plasma produzido pelos mesmos e respetiva análise espectroscópica (resultados apresentados no Capítulo V), optou-se pelo desenvolvimento do dispositivo com a terceira configuração ilustrada: o eléctrodo construído a partir de um fio de cobre esmaltado. Desse modo, o eléctrodo produzido corresponde a um enrolamento em espiral de um fio de cobre com 1 mm de espessura e 7 mm de altura, o correspondente a 7 voltas, (Figura 4.11 (c)).

Uma vez determinada a configuração ideal do dispositivo em termos da estabilidade do jato de plasma, procedeu-se ao revestimento do dispositivo de forma a facilitar não só o seu manuseamento de modo seguro, bem como a automação do sistema. Para tal, o dispositivo foi acoplado a um posicionador vertical e simultaneamente a uma craveira digital, para tornar o sistema mais automático e preciso para posterior realização dos ensaios celulares.

Ao nível do revestimento, este foi desenhado no software online *Autodesk® Tinkercad®* e, posteriormente, impresso na impressora 3D da FCT Fablab. Para além do dimensionamento do revestimento em si, houve necessidade de ser igualmente dimensionada e impressa uma peça que permitisse acoplar o dispositivo ao posicionador e que o projetasse ligeiramente para a frente para que, aquando dos tratamentos com o plasma, se pudesse centrar o jato no poço de interesse com maior facilidade (foi necessário ter em consideração o tamanho das microplacas), Figuras 4.12 e 4.13, respetivamente. O material utilizado na impressão de ambas as peças foi o polímero PLA (do inglês, *polylactic acid*, ácido polilático), que já tem sido utilizado em alguns dispositivos médicos e possui como características principais elevadas rigidez e resistência e temperatura de fusão entre os 150 e os 160 °C.

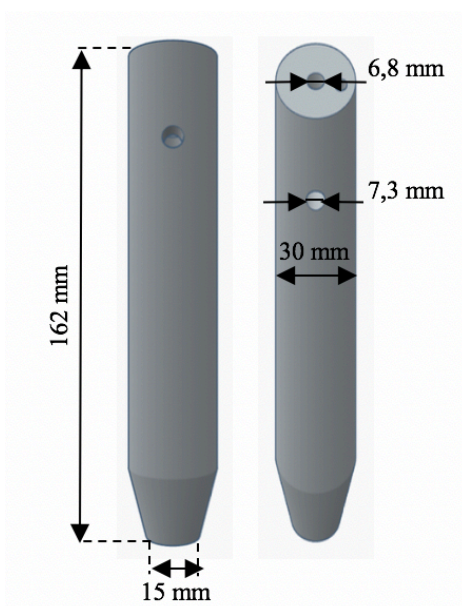


Figura 4.12. Esquema e dimensões do revestimento dimensionado para o dispositivo.

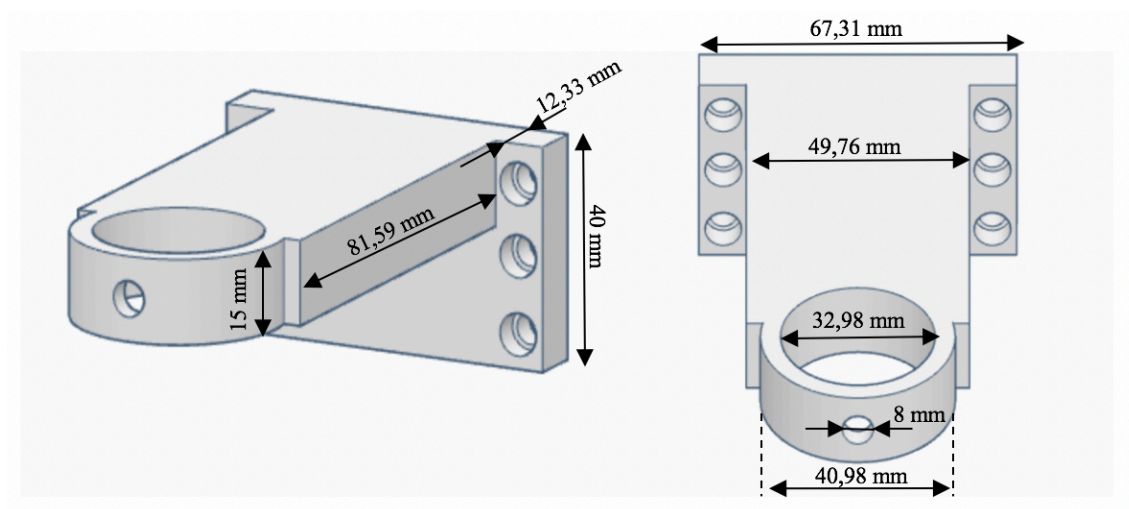


Figura 4.13. Esquema e dimensões do extensor dimensionado para acoplar o dispositivo ao posicionador.

Uma vez impressas as peças, procedeu-se à montagem do sistema na sua totalidade – posicionador, extensor, craveira digital e suporte – bem como ao acoplamento do dispositivo de jato de plasma ao sistema. Desse modo, tal como é possível verificar na Figura 4.14, o posicionador encontra-se fixo a um suporte de acrílico, dimensionado para o efeito, e foi anexado a uma placa de alumínio que permitiu posteriormente fixar o extensor.

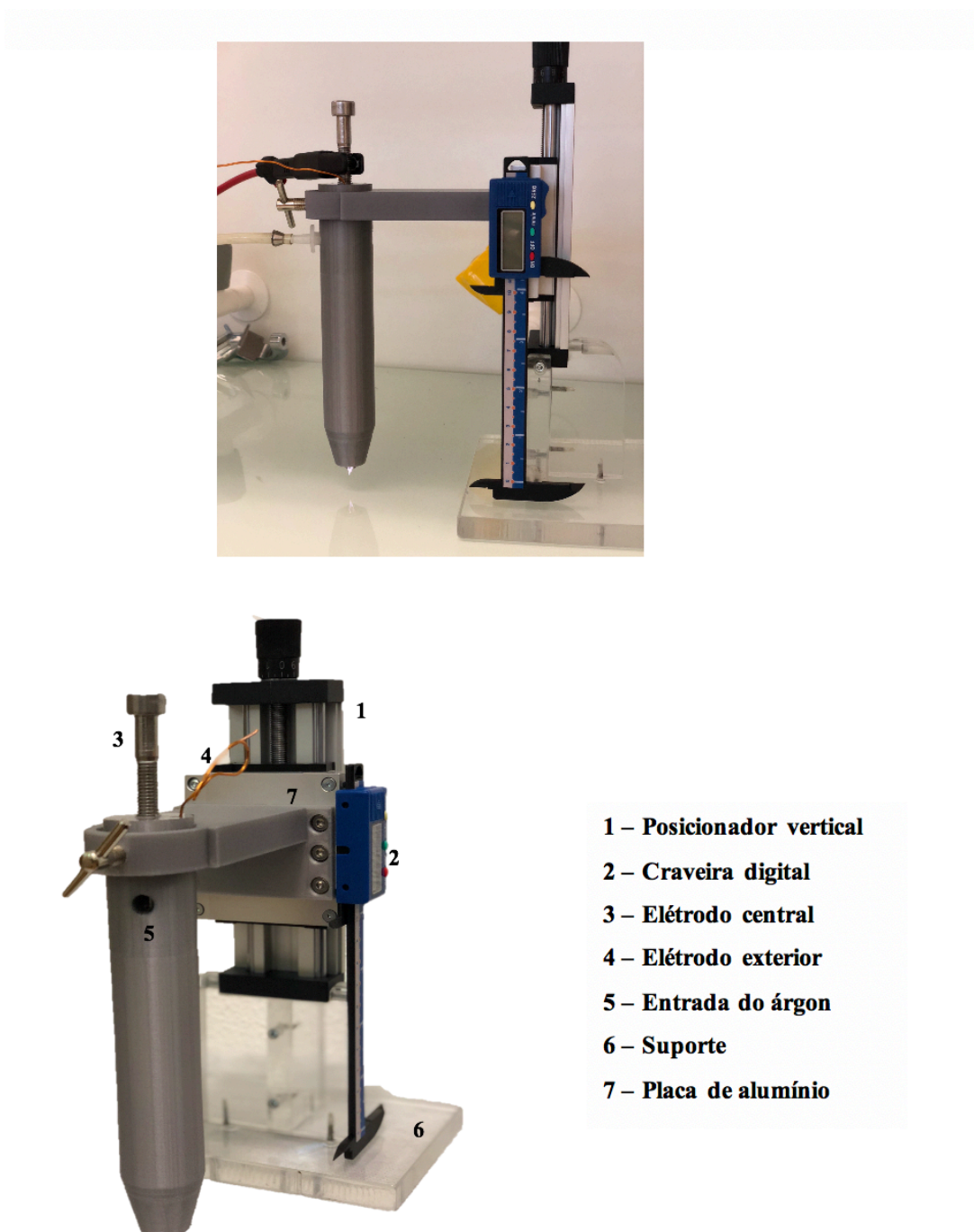


Figura 4.14. Representação do dispositivo final, sendo: 1) Posicionador vertical que foi afixado a um suporte de acrílico; 2) Craveira digital anexada ao posicionador de forma a registar a variações; 3) Eléctrodo interno, agulha de inóx; 4) Eléctrodo exterior, fio de cobre; 5) entrada do gás, árgon; 6) suporte de acrílico; 7) placa de alumínio para permitir anexar extensor ao posicionador.

A craveira digital foi incorporada ao posicionador e à placa de alumínio para tornar precisa a subida e a descida do dispositivo. Desse modo, e com o intuito de se poder determinar precisamente a que distância o jato de plasma se encontrava dos poços no momento dos tratamentos, o método utilizado foi o seguinte: na craveira foi feita a marcação do zero no momento em que a parte inferior do dispositivo (tubo de borossilicato) tocava o topo superior do poço da microplaca. Assim, qualquer movimento posterior feito pelo posicionador era indicado na craveira tendo sempre como referência o zero inicialmente definido e, consequentemente, permitindo saber qual a distância em relação ao topo do poço.

O dispositivo encontra-se fixo ao extensor por um rosca M8, possui na lateral a entrada para o argon e na parte superior as duas ligações aos eletrodos. A rosca central (3 da Figura 4.14) corresponde à entrada da agulha de inóx (eletrodo interno) e à ligação ao *ground* da fonte de tensão, e o fio (4 da Figura 4.14) corresponde ao eletrodo de cobre (eletrodo externo) e à ligação ao terminal de alta tensão da fonte.

Na Figura 4.15, é possível visualizar, mais ao pormenor, o dispositivo final, assim como o jato de plasma obtido após toda a montagem.

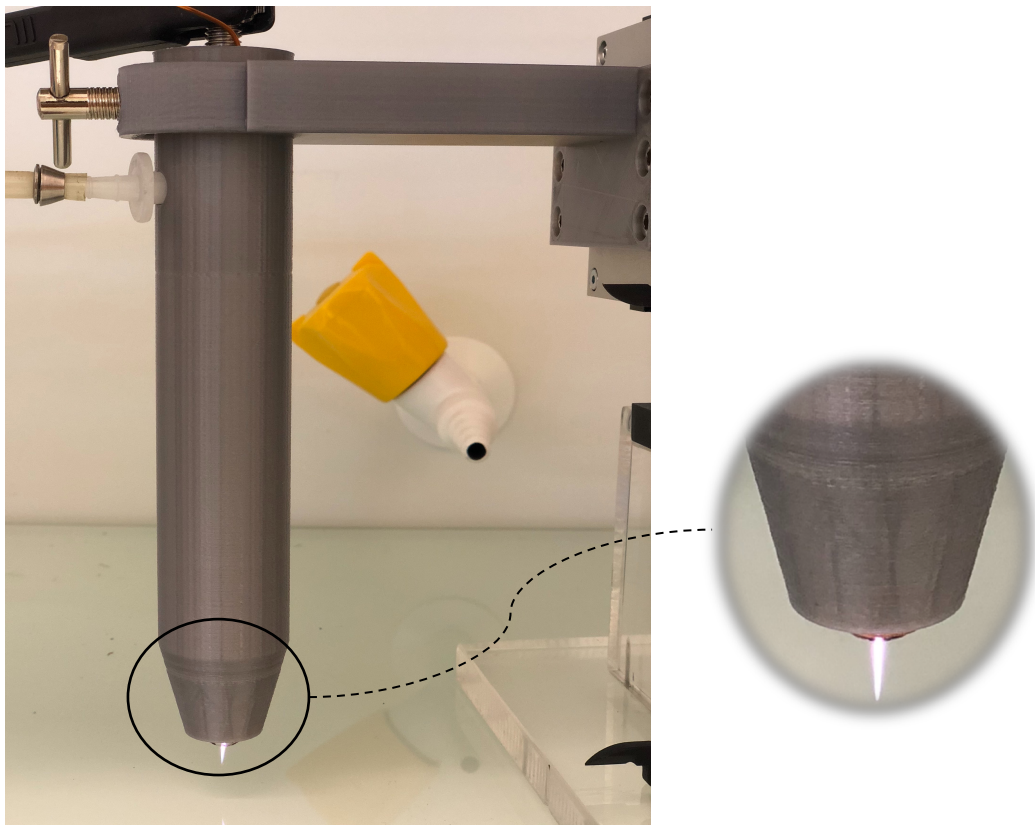


Figura 4.15. Representação do *setup* final e do jato de plasma produzido.

O jato de plasma começa a ser obtido para tensões a partir dos 7 kV, tendo sido, durante todo o trabalho, utilizada uma tensão aproximadamente de 8 kV. Tal como já era esperado, a partir do momento em que ocorre a disrupção do árgon e se começa a produzir o plasma, a tensão sofre um decréscimo considerável tendo, durante os testes, diminuído para uma tensão de, aproximadamente, 2 kV no momento em que o jato estava formado.

Isto vem explicar o fato de uma tensão mais elevada ser necessária apenas para conseguir causar a disrupção do gás em utilização. Uma vez atingida a disrupção, o processo vai desencadear uma série de interações com o meio ambiente (ar e seus componentes) bem como, no caso dos testes celulares, com o meio celular, não sendo possível manter a tensão fixa no valor responsável pela disrupção do gás. Logo, durante os ensaios celulares a tensão registada foi a tensão acima referida, aproximadamente 2 kV.

5. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados dos estudos realizados no presente trabalho. Numa primeira fase é exposto o estudo realizado ao nível dos eléctrodos, nomeadamente a caracterização do jato de plasma obtido para os diferentes eléctrodos testados e as viabilidades celulares obtidas após os ensaios com os vários eléctrodos. De seguida, são apresentadas as várias condições e variantes testadas nos ensaios celulares, bem como os respetivos resultados. Por fim, são apresentados os estudos do pH e da temperatura obtidos após a exposição do meio ao plasma, de forma a ser possível excluir a influência destes parâmetros nos resultados obtidos.

Ao nível dos ensaios celulares, estes foram todos realizados pelo menos 3 vezes, de forma independente, e com 5/6 réplicas para cada variante, de modo a ser possível efetuar a análise estatística e verificar a fiabilidade e repetibilidade dos resultados obtidos. No entanto, é importante salientar que ensaios celulares são bastante complexos, sendo normalmente interpretado cada resultado com uma tolerância aceitável de aproximadamente $\pm 10\%$. Os resultados da viabilidade são apresentados como fração da viabilidade celular normalizada ao controlo (viabilidade relativa).

5.1. Validação dos Eléktrodos

5.1.1. Caracterização do jato de plasma

Tal como mencionado anteriormente, para estudar a composição do jato de plasma obtido foi utilizada a técnica da espectroscopia ótica de emissão. Assim, de forma a verificar se os três eléctrodos (anel de cobre, fio de cobre e anel de titânio) iriam originar jatos com a mesma composição, efetuou-se o espectro de emissão ótica da descarga do árgon para cada um dos eléctrodos exatamente nas mesmas condições experimentais, tal como representado na Figura 5.1.

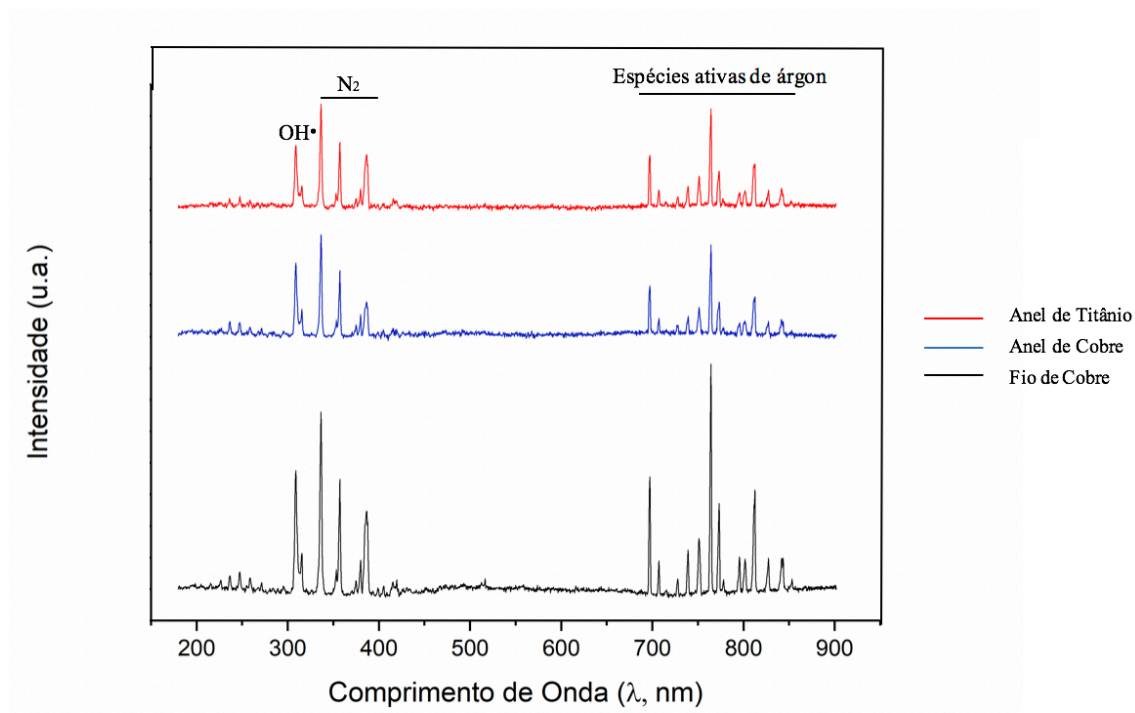


Figura 5.1. Caracterização do jato de plasma para os 3 eletrodos diferentes. Espectros referentes as espécies existentes no jato de plasma obtido para os diferentes eletrodos (anel de titânio, anel de cobre e fio de cobre). Os espectros encontram-se representados separados por um *offset* no eixo das ordenadas (Intensidade).

De salientar que na Figura 5.1, os três espectros apresentados encontram-se separados por um *offset* apenas para facilitar a comparação entre si e a sua ilustração simultânea.

Pela análise dos espectros é possível verificar facilmente que foram obtidos picos cujos comprimentos de onda coincidem perfeitamente. As diferenças verificadas ao nível de intensidade (em unidades arbitrárias, u.a.) entre os picos para os mesmos comprimentos de onda, não permite que sejam feitas comparações ao nível de intensidades relativas, uma vez que essa intensidade corresponde a contagens e o seu valor pode ter sido facilmente influenciado no momento da obtenção dos espectros, por exemplo, por pequenas diferenças na distância entre a fibra ótica e o jato de plasma, assim como no ângulo de posicionamento da mesma.

Tal como se pode observar, a gama onde se verificou o aparecimento dos picos encontra-se entre os 300 nm e os 850 nm, aproximadamente. Não tendo sido detetados picos entre os 400 e os 700 nm, torna-se mais específico referir que os picos de emissão foram detetados entre os 300 - 400 nm e entre os 700 - 850 nm, gamas essas que correspondem a radiação ultravioleta (UV) e, visível (Vis) e infravermelha (NIR, do inglês – *near-infrared*, que compreende a gama entre 750 e 1400 nm), respetivamente.

Tal como já foi citado no Capítulo II, o plasma possui na sua composição fotões UV e a emissão desses fotões pelas fontes de CAP é um fenómeno que já foi comprovado e é esperado.

A radiação UV compreende a gama de comprimentos de onda dos 100 - 400 nm, subdividindo-se em três subtipos: UV-A (315 - 400 nm), UV-B (280 - 315 nm) e UV-C (100 - 280 nm) [48, 49]. A radiação, da A para a C, diminui em comprimento de onda, no entanto, aumenta em termos de potenciais danos biológicos, sendo a radiação UV-C a que maior risco acarreta, podendo mesmo originar mutações ao nível celular.

Assim, é possível concluir pela análise dos espectros da descarga de plasma de árgon para os diferentes elétrodos que nenhum pico foi obtido na gama da radiação UV-C. É possível, ainda, identificar um pico de emissão pertencente ao radical hidroxilo (OH^\bullet) na região UV-B a um comprimento de onda de aproximadamente 308 nm e picos entre os 330 e os 380 nm correspondentes a emissão de azoto molecular (N_2) na região UV-A. É importante salientar que a radiação UV acima dos 200 nm é capaz de penetrar o meio líquido e, conseqüentemente, aumentar os efeitos causados nos sistemas biológicos [43].

Uma vez que o plasma foi obtido em contacto com o ar ambiente (o árgon interagiu com o ar circundante), o jato de plasma possui na sua composição elementos derivados das interações com o ar. Conseqüentemente, é expectável que os espectros obtidos possuam picos correspondentes às espécies constituintes do ar circundante [52]. Assim, uma vez que o gás utilizado para a obtenção do plasma foi o árgon (sem a presença de oxigénio e/ou azoto), é possível verificar, pela análise dos espectros obtidos, que o resultado é efetivamente uma mistura de, maioritariamente, árgon, azoto e oxigénio, sendo o azoto e o oxigénio resultado da interação com o ar. Desse modo, os picos correspondentes às RNS e ROS resultam da mistura entre o Ar e o ar ambiente.

Os picos referentes aos átomos de Ar excitados (espécies ativas de árgon) encontram-se na gama restante, entre os 700 e os 850 nm (radiação visível e infravermelha).

Assim, é possível concluir que os três elétrodos originam jatos de plasma constituídos pelas mesmas espécies, apresentando espectros praticamente iguais, o que os torna, do ponto de vista espectroscópico, equivalentes.

Os espectros foram todos obtidos para as mesmas condições utilizadas nos tratamentos celulares, ou seja, com fluxo de árgon de 3 slm e 30 segundos após a ignição do plasma para garantir que as condições fossem o mais equivalentes possível.

De modo a ser possível concluir sobre a eficácia e validade dos três elétrodos no contexto celular, foram realizados ensaios celulares para os mesmos.

5.1.2. Estudo da viabilidade celular para os diferentes elétrodos

Com o intuito de estudar a validade de cada um dos elétrodos testados, bem como a existência de uma uniformidade nos resultados obtidos pelo tratamento com os mesmos, foram realizados ensaios para os 3 diferentes elétrodos para ambas as linhagens celulares, HGF-1 e SCC-15, e para tempos de exposição de 3 e 3,5 minutos.

Os testes foram realizados todos nas mesmas condições e utilizaram-se os seguintes parâmetros: 2 mL de meio a tratar e 100 μ L do meio tratado transferido para poços de placas de 96, com aproximadamente 3 500 células por poço.

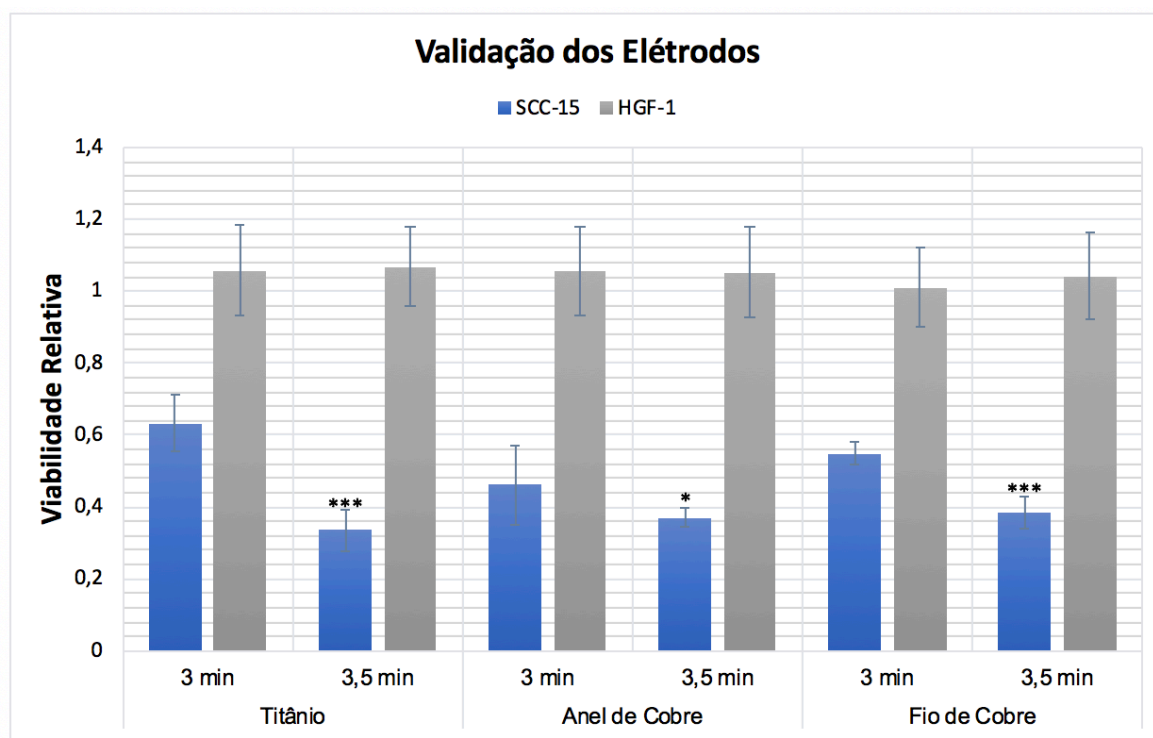


Figura 5.2. Viabilidades relativas obtidas para tratamentos de 3 e 3,5 minutos com os diferentes elétrodos. As viabilidades foram obtidas comparativamente ao grupo de controlo (grupo que não sofreu qualquer tratamento) 48 h após os tratamentos. Resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de, no mínimo, três testes realizados de forma independente e em sextuplicado. No âmbito da análise estatística, o teste *t-student* foi efetuado e as significâncias obtidas em relação aos 3 minutos para cada eléctrodo e linhagem celular, encontram-se representados como *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Pela análise da Figura 5.2, é possível verificar que os diferentes elétrodos originam resultados pouco díspares para ambas as linhagens celulares. Tal como esperado, obtém-se viabilidades maiores para o período de exposição mais curto, o que comprova o facto de efeitos do plasma serem dependentes do tempo de exposição. Adicionalmente, pode ser comprovada a seletividade do CAP para as células cancerígenas uma vez que, para os três elétrodos se obtém viabilidades

significativamente inferiores para a linhagem cancerígena em comparação com a de HGF-1, onde as viabilidades resultantes foram sempre iguais ou superiores a 100%, indicando que o tratamento não teve efeitos negativos expressivos na viabilidade do tecido saudável.

Ao nível de equivalência entre elétrodos, é possível verificar uma grande semelhança nos resultados obtidos para os três elétrodos, principalmente para ambos os elétrodos de cobre. Para as SCC-15, aos 3,5 minutos obtiveram-se viabilidades entre os 30% e os 40% para os três elétrodos e aos 3 minutos a viabilidade resultante foi de aproximadamente 50% para os elétrodos de cobre e ligeiramente superior a 60% para o eletrodo de titânio.

Ao nível da análise estatística, realizada a partir do teste *t-student*, é possível verificar que, para os três elétrodos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas viabilidades obtidas entre os 3 e 3,5 minutos de tratamento para a linhagem SCC-15. No entanto, o mesmo não se verifica para a linhagem de HGF-1 onde a viabilidade se mantém praticamente inalterada em ambos os períodos de exposição.

Desse modo, é possível validar os três elétrodos uma vez que foram obtidos resultados coincidentes e que vêm corroborar a existência de uma seletividade significativa para as células cancerígenas. Uma vez comprovada a validade dos elétrodos, os restantes testes foram todos efetuados apenas para o eletrodo feito a partir do fio de cobre, uma vez que este permitia obter um jato de plasma sensivelmente mais estável e extenso.

5.2. Tratamento com o CAP: estudo das variáveis associadas

O procedimento utilizado neste trabalho para validação do dispositivo produzido, tal como já foi mencionado, foi o tratamento *in vitro* pelo método indireto. Neste tratamento, uma dada quantidade de meio celular é exposto ao CAP e, posteriormente, uma parte é transferida para poços de uma microplaca onde um número pré-definido de células se encontram aderidas.

Dada a complexidade do processo e às diferentes variáveis a si associadas, foi necessário realizar testes para condições diferentes, com o intuito de determinar as condições “ótimas” de trabalho, nomeadamente: número de células a utilizar por poço, quantidade de meio a tratar, quantidade de meio a transferir para cada poço após a exposição ao plasma e, por último, os tempos com maior significado biológico.

De seguida, uma vez selecionadas as variáveis em termos do posicionamento do *setup*, fluxo de argon, número de células e volumes a utilizar, é importante determinar, ao nível do tempo

de exposição, qual o tempo que origina, na linhagem SCC-15, uma viabilidade à volta dos 50%, TE₅₀ (Tempo de Exposição para uma redução na viabilidade de, aproximadamente, 50%). Por outro lado, é necessário que os resultados comprovem a seletividade da técnica para as células cancerígenas. Desse modo, é essencial que a viabilidade da linhagem de HGF-1 seja significativamente superior evidenciando, assim, que o tratamento com o CAP pode ser um potencial método de tratamento cancerígeno que praticamente não afetaria o tecido saudável circundante.

Neste contexto, foi efetuado o estudo da influência das diferentes variáveis associadas aos tratamentos com o CAP - número de células a utilizar por poço, quantidade de meio a tratar, quantidade de meio a transferir para cada poço após a exposição ao plasma e, por último, os tempos com maior significado biológico – de forma a possibilitar o entendimento da contribuição de cada uma, bem como compreender a complexidade do processo que se encontra por detrás dos resultados obtidos.

Durante toda a etapa de teste de condições experimentais, foram utilizadas apenas as células cancerígenas, que representam as células-alvo dos tratamentos, sendo assim crucial perceber quais os mecanismos que originam efeitos mais significativos. Na última etapa, uma vez definidas as condições de trabalho, foi novamente efetuado o estudo para diferentes tempos de exposição, mas, desta vez, para ambas as linhagens, SCC-15 e HGF-1, de forma a possibilitar a confirmação da seletividade do tratamento com o CAP e, consequente, a validação do dispositivo construído.

5.2.1. Influência do número de células

Tal como mencionado anteriormente, para entender a influência do número de células nos tratamentos, foram realizados ensaios para diferentes números de células por poço. Tendo em conta alguma da literatura existente sobre o assunto, escolheu-se testar os seguintes valores de células/poço: 2×10^4 ; $3,5 \times 10^3$ e 2×10^3 .

Os resultados obtidos correspondem à leitura da viabilidade 48 h após os tratamentos para um volume de meio tratado de 1 mL e 100 μ L desse mesmo meio transferido para os poços com células.

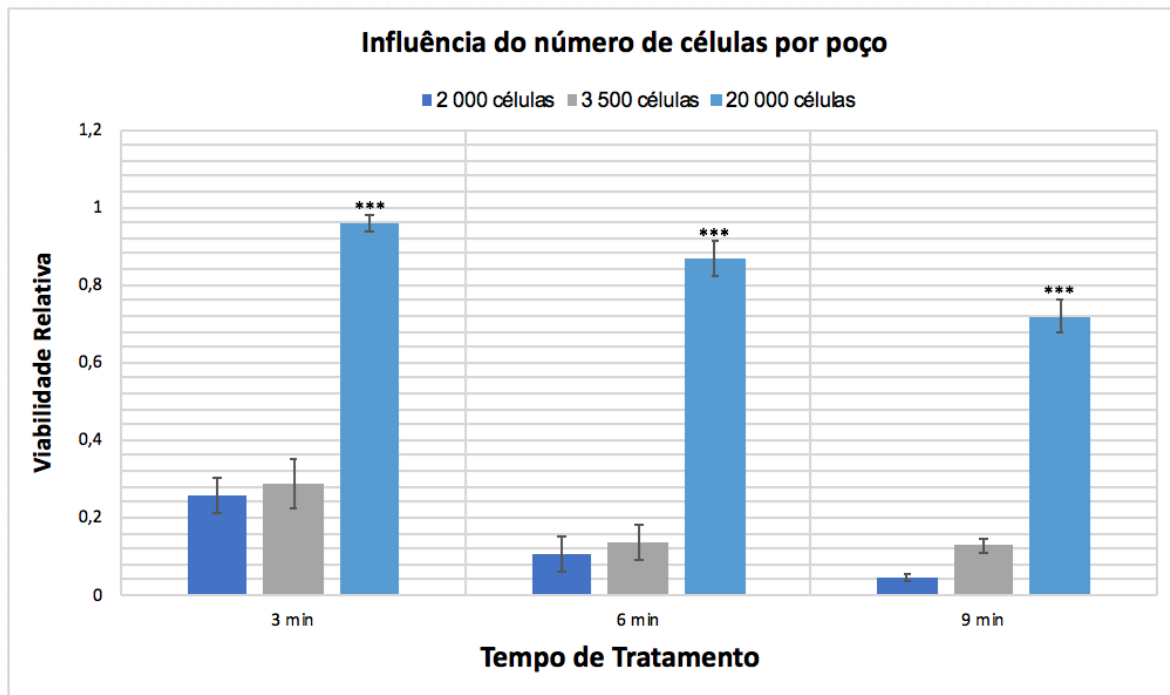


Figura 5.3. Efeito do tratamento com o CAP para diferentes confluências celulares. Os resultados representam a média \pm o desvio padrão de, no mínimo, três testes realizados de forma independente com seis réplicas cada. No âmbito da análise estatística, o teste *t-student* foi efetuado e as significâncias obtidas para cada tempo de tratamento em relação a primeira barra encontram-se representados como *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tal como é possível verificar facilmente através da Figura 5.3, o número de células a tratar é um fator crucial na determinação do tempo de exposição necessário para os efeitos pretendidos. Para uma confluência celular de 2 000 e 3 500 células, para tempos de exposição de 3 minutos a viabilidade obtida foi à volta dos 30% e para tempos de 9 minutos inferior a 20%. No entanto, para um número de células superior em uma ordem de grandeza, 20 000 células, obtiveram-se viabilidades superiores a 70%, mesmo após os 9 minutos de tratamento.

Estes resultados evidenciam que, para as mesmas condições, um maior número de células exige um maior tempo de exposição ao plasma para a obtenção de viabilidades semelhantes. Tal facto, vem corroborar com os estudos efetuados por Dayun *et al.*, onde se concluiu que a capacidade anticancerígena dos tratamentos com o CAP é determinada pela ação do CAP célula-a-célula e não num todo [53]–[56].

A análise estatística foi realizada para os diferentes valores de células por poço para cada período de exposição, e as significâncias foram obtidas em função da primeira barra para cada tempo (2 000 células). De acordo com os resultados estatísticos, e tal como é facilmente comprovado pela análise do gráfico, para cada tempo de exposição apenas foram obtidas diferenças

significativas entre os resultados quando os tratamentos foram efetuados para as 20 000 células, tendo sido obtidos valores de viabilidade muito mais elevados. Isto vem comprovar o fato de ser necessário adaptar o tempo de tratamento tendo em conta o tamanho da zona a tratar.

Após esta etapa, decidiu-se efetuar os restantes testes apenas com as 3 500 células por poço, permitindo assim reduzir os tempos de exposição necessários bem como evitar um maior, e desnecessário, gasto de células e árgon. Optou-se pelas 3 500 células no lugar das 2 000 dado que os resultados das viabilidades obtidas eram semelhantes e assim foi possível trabalhar com um número de células ligeiramente superior.

5.2.2. Influência dos volumes de meio

De seguida, uma vez selecionado o número de células a utilizar nos tratamentos (3 500 células/poço), fez-se variar o volume de meio a tratar bem como o volume que, de seguida, era transferido para os poços contendo células. O objetivo desta abordagem foi verificar a existência, ou não, de uma dependência dos resultados em relação aos volumes de meio utilizados durante o processo de tratamento indireto.

Desse modo, foram realizados ensaios para volumes de meio a tratar distintos (1 e 2 mL de DMEM sem piruvato), bem como para diferentes volumes de meio tratado que era posteriormente transferido para os poços com as células em cultura (100 e 150 μ L). Com o objectivo de verificar a consistência dos resultados obtidos, os ensaios foram realizados para dois tempos de exposição ao CAP, nomeadamente 3 e 6 minutos.

Pela análise da Figura 5.4 é possível verificar que, para ambos os tempos de tratamento, foram obtidas viabilidades menores para o volume de 1 mL, o que sugere a existência de uma relação inversamente proporcional entre o volume do meio tratado e a capacidade desse meio de causar a morte celular. Isto é, verificou-se uma diminuição da efetividade do meio tratado com o CAP quando o seu volume era maior. Este facto pode ser explicado pela diluição das espécies reativas que ocorre durante o tempo de exposição. Quanto maior for a quantidade de meio a tratar mais diluídas estão as espécies e, consequentemente, menor a sua concentração nesse meio. Assim, ao ser de seguida colocada uma pequena quantidade desse mesmo meio tratado em contato com as células, vai ser menor o efeito (maior viabilidade) caso o meio tratado corresponda ao volume maior; ou seja, uma vez que está menos concentrado, é menor o efeito das espécies reativas.

De seguida, ao nível dos volumes de meio a colocar nos poços contendo células, verificou-se que as viabilidades resultantes foram menores quando menores volumes de meio foram colocados nos poços, isto é 100 μ L em vez de 150 μ L.

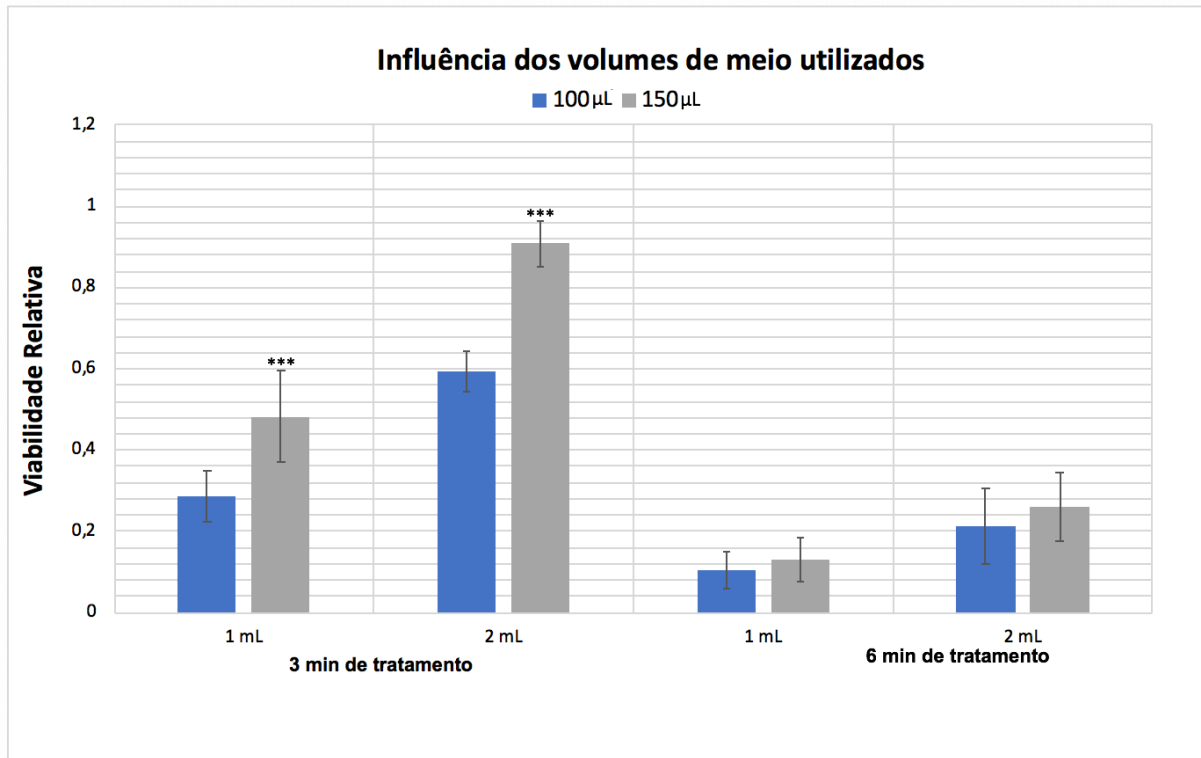


Figura 5.4. Efeito do CAP para diferentes volumes de meio. Os ensaios foram efetuados para 3 e 6 minutos de exposição ao CAP. Para cada tempo de tratamento estudou-se a influência de tratar 1 ou 2 mL de DMEM sem piruvato e de, posteriormente, colocar 100 ou 150 μ L nos poços com células. Os resultados obtidos representam a média \pm o desvio padrão de, pelo menos, três ensaios realizados de forma independente e com seis réplicas para cada. O teste *t-student* foi realizado para 3 e 6 minutos de tratamento e os resultados das significâncias nos diferentes volumes de meio tratado (1 e 2 mL) foram obtidos em relação à primeira barra (100 μ L) e estão representados como *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Ao nível da análise estatística, diferenças estatisticamente significativas entre os 100 ou 150 μ L foram obtidas apenas para os 3 minutos de exposição. Para 1 mL e 100 μ L a viabilidade foi de, aproximadamente, 30% enquanto que com 150 μ L foi de, aproximadamente, 50%. Para os 2 mL verificou-se uma discrepância maior, tendo sido obtida uma viabilidade à volta dos 60% e 90% para os 100 μ L e os 150 μ L, respetivamente.

Uma vez comprovada a dependência da efetividade do meio tratado com o CAP em relação ao volume de meio e número de células utilizados durante os ensaios, estabeleceu-se como condições de trabalho as 3 500 células/poço e os volumes de 2 mL e 100 μ L de meio a tratar e a transferir, respetivamente. Uma vez que após cada exposição de meio ao plasma, foi verificada

alguma evaporação do meio, optou-se pela utilização dos 2 mL de modo a garantir que o volume obtido após a exposição seria suficiente para preencher os poços correspondentes (incluindo as 5/6 réplicas por condição e por linhagem celular). Caso contrário, seria necessário efetuar duas exposições de meio para cada condição, o que poderia acarretar erros nos resultados obtidos. De seguida, optou-se pela utilização de 100 μ L (ao invés de 150 μ L) uma vez que origina valores de viabilidade relativa mais baixos.

5.2.3. Influência do tempo de tratamento e seletividade

Com o intuito de perceber com maior detalhe a influência do tempo de exposição do meio ao CAP nos resultados obtidos, bem como efetuar uma comparação entre os efeitos causados em ambas as linhagens, foram realizados ensaios entre os 2,5 e os 4 minutos nas condições acima referidas (2 mL, 100 μ L e 3 500 células/poço) e com a leitura da viabilidade efetuada 48 h após os tratamentos de plasma.

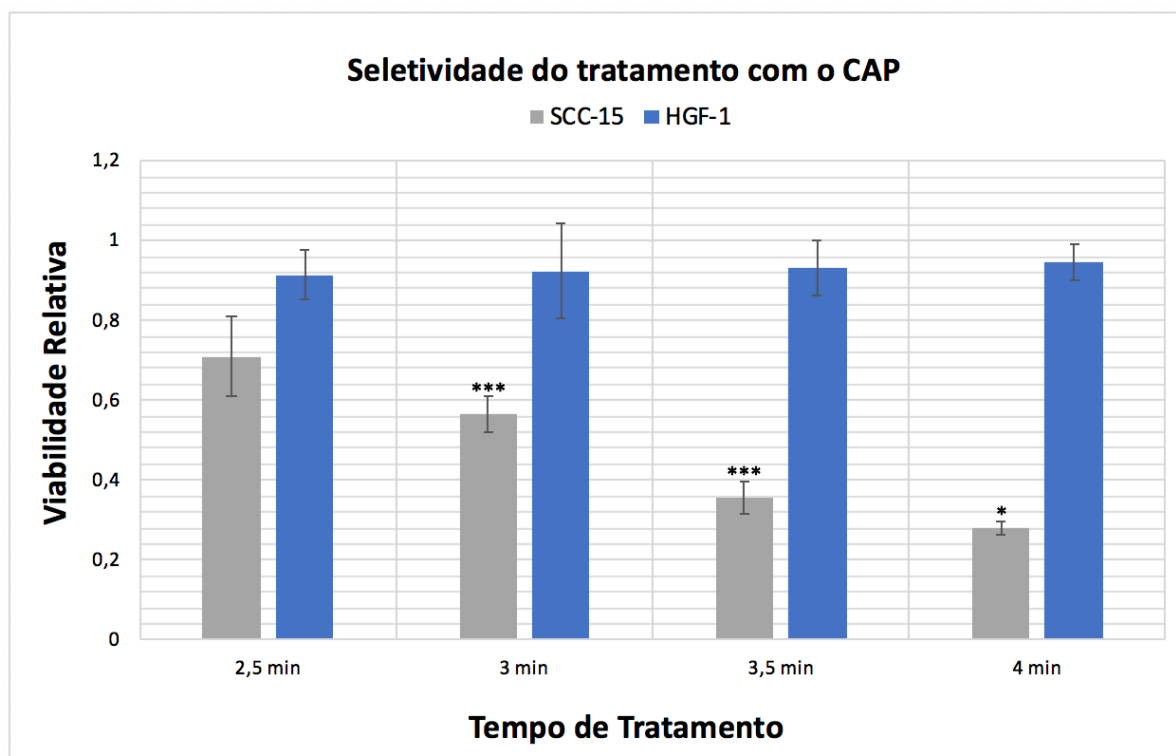


Figura 5.5. Seletividade do tratamento com o CAP e influência do tempo de tratamento. Os ensaios foram realizados para ambas as linhagens celulares, SCC-15 e HGF-1. Os resultados apresentados correspondem a média \pm o desvio padrão de, no mínimo, três ensaios realizados de forma independente e com cada variante (tempo de exposição) sextuplicada. O teste *t-student* foi realizado para cada linhagem celular e os resultados das significâncias entre os diferentes tempos de exposição foram obtidos em relação ao tempo anterior (2,5 vs. 3, 3 vs. 3,5 e 3,5 vs. 4 minutos) e estão representados por *** $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Tal como é possível verificar, pela análise da Figura 5.5, a viabilidade celular da linhagem de HGF-1 praticamente não é afetada pelo CAP tendo sido obtidos resultados de viabilidade sempre à volta dos 90% mesmo após os 4 minutos de exposição. No caso das células cancerígenas, SCC-15, o mesmo não se verifica, obteve-se uma diminuição significativa da viabilidade com o aumento do tempo de tratamento, revelando uma dependência entre os efeitos causados e o tempo de exposição do meio ao CAP.

Os resultados obtidos permitem, mais uma vez, comprovar a existência da seletividade do CAP para as células cancerígenas uma vez que para os todos os tempos de tratamento testados se obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre as viabilidades relativas de ambas as linhagens, principalmente para os tempos de tratamento maiores: aos 3 minutos obteve-se uma diferença de aproximadamente 40% e aos 4 minutos de 60%.

Deste modo, os resultados obtidos revelam que o CAP possui efetivamente a capacidade de causar a morte seletiva das células cancerígenas deixando o tecido saudável circundante praticamente sem efeitos negativos tal como tem vindo a ser demonstrado ao longo da literatura [19, 21, 25, 30].

Ao nível da linhagem SCC-15, aos 2,5 minutos obteve-se uma viabilidade de aproximadamente 70%, no entanto, aos 3,5 minutos de exposição a viabilidade obtida já foi inferior aos 40%, comprovando o facto de os resultados serem fortemente dependentes do tempo de tratamento. A redução da viabilidade celular para 50% foi verificada para o tempo de exposição à volta dos 3 minutos, correspondendo assim ao TE_{50} . Mais especificamente, ao nível da linhagem cancerígena é possível verificar que variações de 30 segundos no tempo de exposição são suficientes para causar diferenças significativas na viabilidade celular relativa (obtida em relação ao grupo de controlo) tal como foi comprovado pela análise estatística.

Foi realizado o teste *t-student* para cada linhagem de forma a estimar as significâncias relativas aos diferentes tempos de exposição. Pelos resultados da análise, Figura 5.5, é possível comprovar que para a linhagem de HGF-1 não são obtidas diferenças estatisticamente significativas nas viabilidades para nenhum dos diferentes tempos de exposição testados. No entanto, o mesmo não foi verificado para a linhagem cancerígena, onde se obtiveram diferenças significativas entre todos os tempos de tratamento (2,5; 3; 3,5 e 4 minutos) vindo assim a demonstrar a real existência de uma forte dependência entre a efetividade do tratamento com o CAP e os tempos de tratamento efetuados, tal como demonstrado ao longo da literatura sobre o assunto [11, 35, 52].

Assim, tendo em conta o estudo realizado para as diferentes variáveis do tratamento com o CAP, é possível concluir que existe efetivamente uma forte dependência dos resultados obtidos

relativamente a todas as variáveis estudadas ao longo deste trabalho (número de células, volumes de meio e tempo de tratamento). Tal facto vem evidenciar a complexidade do processo e a necessidade de se definir os parâmetros previamente, de forma a verificar a uniformização e repetibilidade dos resultados obtidos.

5.3. Estudo do PH do meio tratado

De modo a avaliar se os efeitos medidos nas viabilidades celulares após a exposição ao plasma podiam ser uma consequência de alterações do pH do meio após os tratamentos, efetuou-se a medição do seu pH antes e após o tratamento.

Os resultados indicaram que a exposição ao plasma não é capaz de causar alterações significativas no pH do meio de cultura celular (DMEM sem piruvato) mantendo-se, assim, a um pH estável mesmo após 4,5 minutos de exposição ao plasma, como se pode verificar na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Medição do pH do meio antes e após 4.5 minutos de exposição ao plasma, CAP.

Medição do pH	
Antes da exposição ao CAP	Após exposição ao CAP
8,359 ± 0,001	8,552 ± 0,001

A ligeira subida de 2 décimas verificada ao nível do pH pode ser explicada pelo fato de, durante a exposição do meio ao CAP, ocorrer a dissolução das espécies reativas constituintes do jato de plasma, nomeadamente o OH⁻ presente no jato de plasma produzido (Figura 5.1) que, como se sabe, tem um carácter básico.

Ao nível de alterações macroscópicas do meio após a exposição, foi possível apenas verificar que o meio se torna ligeiramente mais viscoso. Tal pode ser justificado pelo facto de, no momento da exposição, uma pequena quantidade do meio evaporar alterando assim a sua concentração.

5.4. Estudo da temperatura do meio tratado

De seguida, de forma a descartar qualquer possibilidade de que os resultados obtidos pelos tratamentos com o CAP possam ser fruto de efeitos térmicos no meio tratado, efetuou-se a medição da temperatura do meio durante a sua exposição ao plasma até 270 segundos, Figura 5.6.

A medição da temperatura do meio foi feita a partir de um multímetro associado a um termopar tipo k (constituído por crómio e alumínio). Este tipo de sensor de temperatura é muito

utilizado por ser relativamente barato e de fácil utilização, permitindo medir temperaturas entre os -50 e os 1000°C , com uma resolução de 1°C .

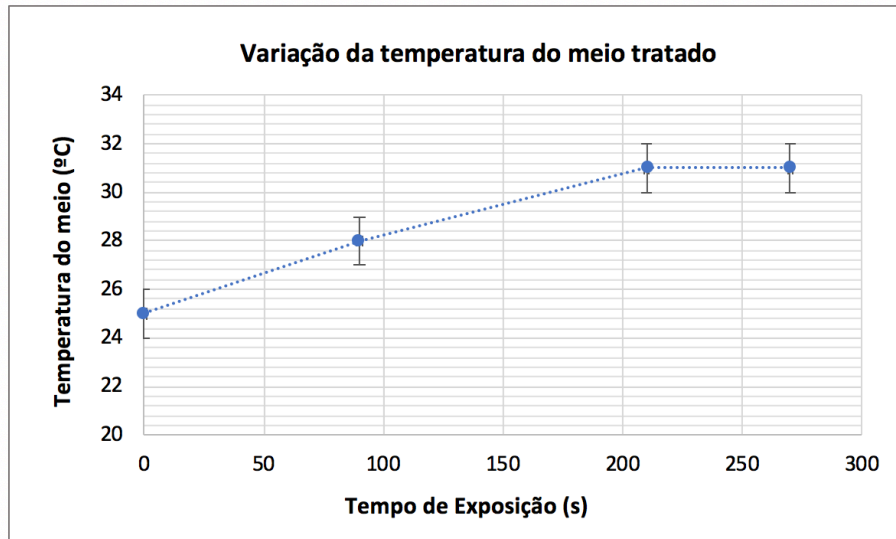


Figura 5.6. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) do meio após exposição ao plasma até 270 segundos (4,5 minutos). Linha a tracejado apresentada apenas para facilitar a visualização.

Tal como é possível verificar, pelo gráfico da Figura 5.6, ao fim de 4,5 minutos (270 segundos) de exposição obteve-se uma temperatura final do meio de 31°C . Tendo em conta que o limiar da tolerância celular sem danos térmicos se encontra à volta dos 40°C (a temperatura do tecido não deve exceder os 40°C), conclui-se assim que a temperatura final máxima obtida não é suficiente para causar danos térmicos às células [57]. Desse modo, os resultados obtidos após os ensaios celulares não são uma consequência de efeitos térmicos provocados pela exposição do meio ao plasma, mas sim do stress oxidativo causado pela presença de espécies reativas.

6. Conclusões e Trabalho Futuro

Neste capítulo são abordadas as conclusões finais que podem ser retiradas tendo em conta os resultados obtidos pelos vários testes realizados durante todo o trabalho. Adicionalmente, é referido algum do trabalho futuro que seria importante realizar com o intuito de completar a informação fornecida pela presente dissertação.

6.1. Conclusões Finais

Este trabalho teve como principais objetivos o dimensionamento e a construção de uma fonte de alta tensão variável, e contínua (0-20 kV), bem como o desenvolvimento de um dispositivo de jato de plasma frio que pudesse ter aplicações oncológicas, nomeadamente, no tratamento do cancro da pele.

A fonte de alta tensão construída pode ser dividida nos seguintes blocos: fonte de tensão DC, circuito oscilador de amplitude variável, transformador de linhas e retificador. De uma forma geral, a fonte de tensão é responsável por fornecer uma tensão, contínua, variável de 0 a 20 V que é posteriormente, no transformador de linhas, elevada para os 20 000 kV (razão de inversão de 1:1000).

O dispositivo de plasma desenvolvido é constituído por um tubo de borossilicato com um eletrodo interno e um segundo eletrodo externo. O eletrodo interno corresponde a uma agulha de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro e o externo foi produzido a partir de um fio de cobre esmaltado com 1 mm de diâmetro.

Uma vez construída a fonte de alta tensão e decidida a configuração do dispositivo de plasma, procedeu-se ao seu revestimento e acoplamento à um posicionador vertical, finalizando assim toda a fase de dimensionamento e construção.

Como objetivo final, pretendeu-se validar o dispositivo implementado de modo a que, esta tecnologia, possa vir a ter aplicações na medicina, nomeadamente, no tratamento do cancro da pele.

Assim sendo, a técnica estudada teve que reunir características que produzam resultados que venham justificar e potencializar a sua possível introdução no ramo dos tratamentos oncológicos como uma alternativa às técnicas convencionais ou, como uma técnica que possa ser aplicada aliada aos tratamentos atualmente em utilização.

Ao nível da complexidade, foi possível comprovar que esta tecnologia abrange bastantes variáveis e, consequentemente, exige a realização de diversos testes de forma a poderem ser retiradas conclusões corretas e satisfatórias.

Desse modo foram estudados diferentes elétrodos, números de células, volumes de meio a tratar e de meio tratado a ser colocado em contato com as células e, principalmente, diferentes tempos de exposição ao jato de plasma.

Tal como foi possível verificar, existe uma forte dependência entre todas estas variáveis. Isto é, a alteração de uma variável vai obrigar a que alterações sejam efetuadas nas restantes, de modo a originar os mesmos resultados (por exemplo, a utilização de 20 000 células no lugar das 3 500 exige um tempo de tratamento superior para que se obtenha a mesma viabilidade relativa).

Assim, com o intuito de tornar os resultados o mais precisos possível, após os testes das diferentes variantes, foram estipuladas as seguintes condições:

- i. Fluxo de árgon de 3 slm;
- ii. Eléctrodo exterior a 2 mm do fim do tubo de borossilicato;
- iii. Eléctrodo interno a 1 mm do fim do tubo de borossilicato;
- iv. Tubo de borossilicato a 2 mm do topo do poço da placa;
- v. Confluência celular de 3 500 células/poço;
- vi. Tratamento de 2 mL de meio com o CAP;
- vii. Transferência de 100 µL do meio tratado para os poços com células;
- viii. Leitura da viabilidade celular 48 h após os tratamentos.

Ao nível dos resultados obtidos pelo teste de viabilidade enzimático com resazurina, foi possível comprovar que o tratamento indireto com o CAP é uma técnica que, quando aplicada a células cancerígenas e não-cancerígenas, atua seletivamente originando danos significativos nas

cancerígenas e pouco notórios na linhagem de células saudáveis. Para 3 minutos de tratamento, obteve-se uma viabilidade relativa resultante de aproximadamente 50% e 90% para as SCC-15 e HGF-1, respetivamente.

Adicionalmente, e de forma a excluir quaisquer suposições de que os efeitos obtidos após os tratamentos com o CAP pudessem ser devidos a alterações causadas pela exposição do meio ao jato de plasma, realizou-se a medição da temperatura e do pH do meio após 4,5 minutos de exposição. Os resultados demonstraram que as alterações verificadas após a exposição ao CAP não eram suficientes para causar os resultados e efeitos ao nível da viabilidade celular alcançados - verificou-se uma alteração de duas décimas no valor do pH e obteve-se uma temperatura final de 31° C, valor esse que se encontra dentro da gama de temperatura tolerada pelas células, não alterando assim o seu equilíbrio.

Desse modo é possível concluir, pelos estudos realizados ao longo desta dissertação, que o objetivo final foi atingido: o dispositivo produzido fornece resultados positivos e capazes de suportar o potencial da utilização do CAP, nomeadamente do tratamento indireto com o CAP, no tratamento do cancro da pele, mais especificamente, do carcinoma de células escamosas (SCC).

O estudo realizado evidencia também que o dispositivo desenvolvido é capaz de fornecer um tratamento sem provocar danos térmicos (como queimaduras, irritações, entre outros) e com elevada seletividade para as células cancerígenas, vindo assim proporcionar uma enorme vantagem comparativamente às técnicas atualmente vigentes que danificam o tecido saudável circundante. Adicionalmente, uma vez que a técnica estudada foi o tratamento indireto, acresce às suas vantagens o facto deste método potenciar o tratamento de zonas cujo acesso não é possível por tratamento direto.

É importante salientar que os testes realizados, nomeadamente, testes *in vitro*, são efetivamente primordiais e imprescindíveis numa fase inicial vindo a acrescentar e esclarecer teorias sobre os fatores-chave e mecanismos do processo. No entanto, de forma a ser possível, realmente, validar a presente técnica é necessária uma investigação mais aprofundada através de testes que decorram em condições o mais perto das reais, como por exemplo, através de testes *in vivo*.

Para tal, estudos complementares necessitam de ser efetuados sobre o princípio de funcionamento do CAP e a determinação, de forma inequívoca, dos reais mecanismos por detrás dos seus efeitos bem como um acompanhamento pós-tratamento a longo prazo de forma a registar a ocorrência, ou não, de efeitos secundários prejudiciais provenientes da exposição ao CAP.

6.2. Trabalho Futuro

Tal como já foi mencionado, acredita-se que o processo-chave por detrás da atividade seletiva do CAP para as células cancerígenas seja o stress oxidativo causado pela presença de espécies reativas de oxigénio e azoto.

Com o intuito de comprovar a teoria supramencionada, deverá ser efetuada uma análise do meio tratado com o CAP de forma a identificar e quantificar a presença de espécies reativas no meio. Para tal, utiliza-se o reagente Griess (*Griess reagent modified*, Sigma, G4410-10G) que permite detetar e quantificar, mediante uma calibração prévia, a presença de espécies reativas de azoto, nomeadamente, nitrito (NO_2^-).

Seria igualmente interessante efetuar uma análise da presença e concentração de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) no meio tratado, uma vez que este é considerado fundamental na origem dos efeitos biológicos resultantes. A determinação desta espécie é efetuada através de um teste de fluorescência (*Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit*, Sigma) sendo, mais uma vez, necessário que se efetue uma calibração prévia para posterior quantificação da sua presença.

Adicionalmente, de forma a determinar se a morte celular verificada através dos testes de viabilidade celular ocorreu por necrose ou apoptose, seria importante realizar o teste *Annexin V/7-AAD*, que se baseia em marcadores específicos para a apoptose e necrose, respetivamente.

Desse modo, seria possível melhorar a compreensão de alguns dos fatores adjacentes bem como, retirar conclusões acerca da relação entre o tempo de exposição ao CAP, a concentração das substâncias reativas produzidas e a viabilidade celular relativa resultante.

6.3. Trabalhos no âmbito da Tese

❖ Comunicação em painel:

- 1) “*Development of a Cold Atmospheric Plasma Jet Device for Medical Applications*”, **E. Pinto**, S. Pereira, P. A. Ribeiro, S. Sérgio, *3rd Nova Biomedical Engineering Workshop (NBEW)*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica – Portugal, 9/05/2018;

2) “*Study of CAPs treated medium as an in-vitro anti-cancer therapy*”, S. Pereira, **E. Pinto**, P. A. Ribeiro, S. Sérgio, *3rd Nova Biomedical Engineering Workshop (NBEW)*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica – Portugal, 9/05/2018;

❖ Comunicação oral:

“*Non-Thermal Atmospheric pressure Plasmas: Generation, Sources and Applications*”, by S. Pereira, **E. Pinto**, P. A. Ribeiro and S. Sérgio, *15th International Conference on Computational Intelligence methods for Bioinformatics and Biostatistics (CIBB2018)*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica – Portugal, 6-8 Setembro, 2018;

❖ Artigos em jornais de circulação internacional com arbitragem científica:

“*Study of a Cold Atmospheric Pressure Plasma jet device for indirect treatment of Squamous Cell Carcinoma*”, by S. Pereira, **E. Pinto**, P. A. Ribeiro and S. Sérgio, *Clinical Plasma Medicine*. aceite para publicação a 4/Setembro/2018;
<https://doi.org/10.1016/j.cpme.2018.09.001>

Bibliografia

- [1] “WHO | Skin cancers,” *WHO*, 2017.
- [2] “Cancro da pele: conheça os diferentes tipos e como os prevenir.” [Online]. Available: <https://rotasaude.lusiadas.pt/cancro-da-pele-os-diferentes-tipos/>. [Accessed: 07-May-2018].
- [3] S. Ghayourmanesh PhD, “Skin cancer,” *Magill’s Medical Guide (Online Edition)*. 2013.
- [4] J. Ferguson PhD, “Squamous cell carcinomas,” *Salem Press Encyclopedia of Health*. 2014.
- [5] “Types of skin cancer.” [Online]. Available: <https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/skin-layer-have-3-type-cancer-676089217?src=LNv6em67wKjFM3zL7X2e7g-1-6>. [Accessed: 07-May-2018].
- [6] “Treatment Options - SCC.” [Online]. Available: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/squamous-cell-carcinoma/scc-treatment-options>. [Accessed: 08-May-2018].
- [7] P. Rajasekaran, “Atmospheric-pressure dielectric barrier discharge (DBD) in air : Plasma characterisation for skin therapy Priyadarshini Rajasekaran,” 2011.
- [8] W. Crookes, “Experiments on the Dark Space in Vacuum Tubes,” *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character*, vol. 79, no. 528, pp. 98–117, 1907.
- [9] M. J. Pinheiro, “Plasma: the genesis of the word,” p. 3, 2007.
- [10] H. Jo, H. W. Jun, J. Shin, and S. H. Lee, “Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies”, vol. 9, pp. 1–511, 2015.
- [11] H.-R. Metelmann *et al.*, “Head and neck cancer treatment and physical plasma,” *Clin. Plasma Med.*, vol. 3, pp. 17–23, 2015.
- [12] A. M. Hirst, F. M. Frame, M. Arya, N. J. Maitland, and D. O’Connell, “Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future,” *Tumour Biol.*, vol. 37, no. 6, pp. 7021–31, Jun. 2016.
- [13] J. Gay-Mimbrera, M. C. García, B. Isla-Tejera, A. Roderro-Serrano, A. V. García-Nieto, and J. Ruano, “Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer,” *Adv. Ther.*, vol. 33, no. 6, pp. 894–909, 2016.

- [14] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, "Applied plasma medicine," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, 2008.
- [15] M. Deilmann, H. Halfmann, N. Bibinov, J. Wunderlich, and P. Awakowicz, "Low-pressure microwave plasma sterilization of polyethylene terephthalate bottles.," *J. Food Prot.*, vol. 71, no. 10, pp. 2119–23, Oct. 2008.
- [16] M. Moreau, N. Orange, and M. G. J. Feuilleley, "Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 6, pp. 610–617, Nov. 2008.
- [17] G. Farin and K. E. Grund, "Technology of argon plasma coagulation with particular regard to endoscopic applications.," *Endosc. Surg. Allied Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 71–7, Feb. 1994.
- [18] M. G. Kong *et al.*, "Plasma medicine: an introductory review," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115012, Nov. 2009.
- [19] R. Guerrero-Preston *et al.*, "Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 4, pp. 941–946, 2014.
- [20] E. Stoffels, A. J. Flikweert, W. W. Stoffels, and G. M. W. Kroesen, "Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 11, pp. 383–388, 2002.
- [21] M. Keidar *et al.*, "Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy.," *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 9, pp. 1295–1301, Oct. 2011.
- [22] K.-D. Weltmann and T. von Woedtke, "Plasma medicine—current state of research and medical application," *Plasma Phys. Control. Fusion*, vol. 59, no. 1, p. 014031, 2017.
- [23] Z. Chen, X. Cheng, L. Lin, and M. Keidar, "Cold atmospheric plasma discharged in water and its potential use in cancer therapy," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 1, p. 015208, 2017.
- [24] P. Babington, K. Rajjoub, J. Canady, A. Siu, M. Keidar, and J. H. Sherman, "Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer An evaluation of anti-oxidative protection for cells against atmospheric pressure cold plasma treatment Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium at," *Biointerphases Appl. Phys. Lett. Appl. Phys. Lett. Appl. Phys. Lett. Phys. Lett.*, vol. 101, no. 10, pp. 29403–57101, 2015.

-
- [25] O. Volotskova, T. S. Hawley, M. A. Stepp, and M. Keidar, "Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma.," *Sci. Rep.*, vol. 2, p. 636, 2012.
- [26] M. Keidar, "Plasma for cancer treatment," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 24, no. 3, p. 33001, 2015.
- [27] P. Babington, K. Rajjoub, J. Canady, A. Siu, M. Keidar, and J. H. Sherman, "Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer.," *Biointerphases*, vol. 10, no. 2, p. 029403, Jun. 2015.
- [28] M. Schuster *et al.*, "Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer," *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 44, no. 9, pp. 1445–1452, 2016.
- [29] S. Vermeulen *et al.*, "Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells," *Plasma Process. Polym.*, vol. 13, no. 12, pp. 1195–1205, 2016.
- [30] M. Keidar *et al.*, "Cold atmospheric plasma in cancer therapy," *Phys. Plasmas*, vol. 20, no. 5, p. 057101, May 2013.
- [31] M. Laroussi, "Low-Temperature Plasma Jet for Biomedical Applications: A Review," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 703–712, 2015.
- [32] J.-H. Lee, J.-Y. Om, Y.-H. Kim, K.-M. Kim, E.-H. Choi, and K.-N. Kim, "Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma," *PLoS One*, vol. 11, no. 2, p. e0150279, 2016.
- [33] D. Yan, J. H. Sherman, and M. Keidar, "Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 15977–15995, Feb. 2017.
- [34] D. Gümbel *et al.*, "Cold atmospheric plasma in the treatment of osteosarcoma," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 9, pp. 1–14, 2017.
- [35] S. Mohades, N. Barekzi, H. Razavi, V. Maruthamuthu, and M. Laroussi, "Temporal evaluation of the anti-tumor efficiency of plasma-activated media," *Plasma Process. Polym.*, vol. 13, no. 12, pp. 1206–1211, 2016.
- [36] S. J. Kim and T. H. Chung, "Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 20332, Feb. 2016.
- [37] Laroussi, Mounir & Akan, Tamer, Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review. *Plasma Processes and Polymers*. 4. 777 – 788, (2007).

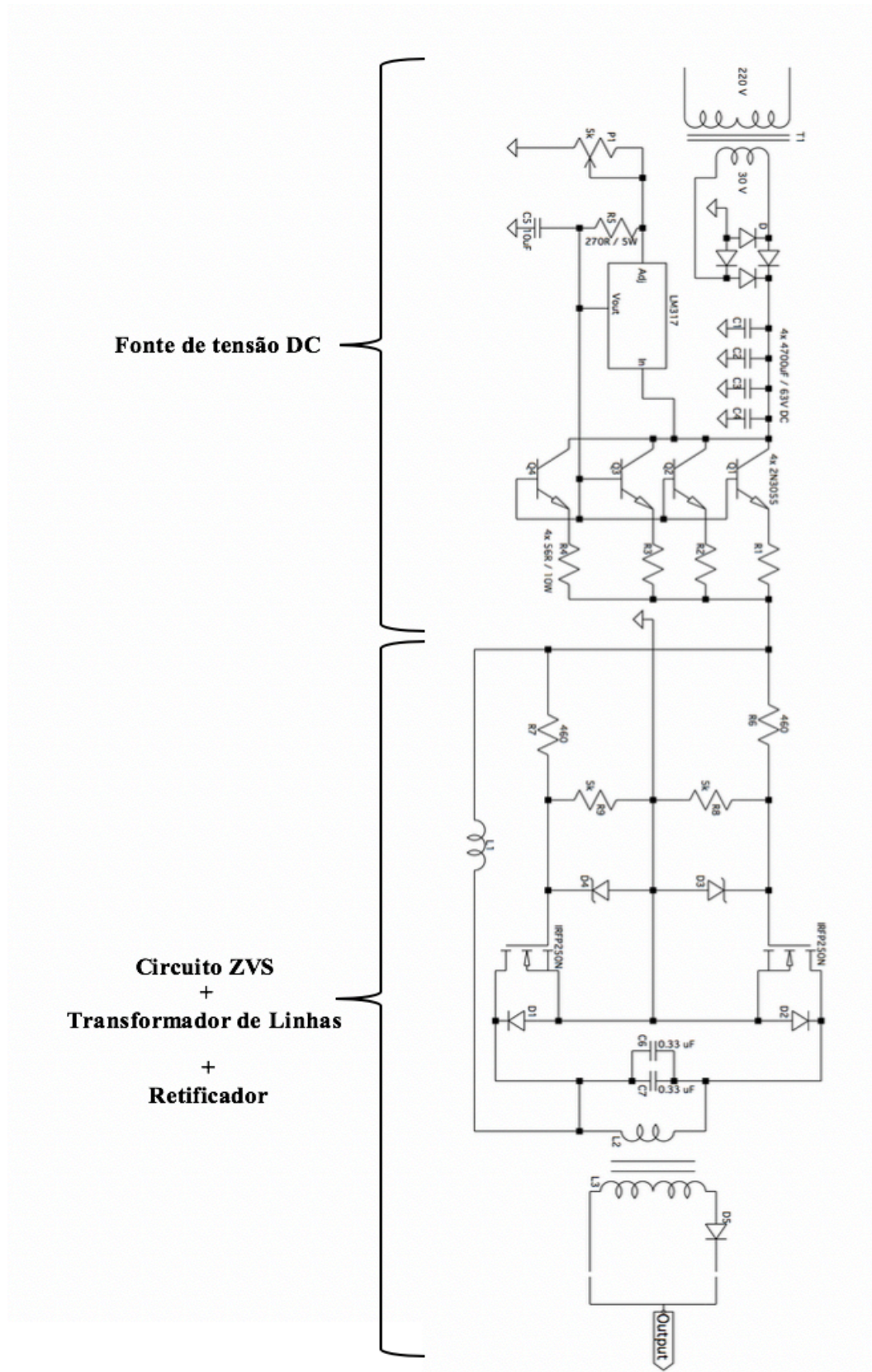
- [38] X. Lu, M. Laroussi, and V. Puech, "On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 21, no. 3, 2012.
- [39] "Paschen's Law," *Merriam-Webster Online Dict.*, 2013.
- [40] "File:Cascade process of ionization.png - Wikimedia Commons." [Online]. Available:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cascade_process_of_ionization.png.
[Accessed: 29-Jan-2018].
- [41] Human Gingival Fibroblasts (HGnF). [Online]. Available:
<https://www.sciencellonline.com/PS/2620.pdf>. [Accessed: 17-Jun-2018]
- [42] S. Bekeschus, A. Lin, A. Fridman, K. Wende, K.-D. Weltmann, and V. Miller, "A Comparison of Floating-Electrode DBD and kINPen Jet: Plasma Parameters to Achieve Similar Growth Reduction in Colon Cancer Cells Under Standardized Conditions," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2018.
- [43] K. Wende *et al.*, "Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet," *Biointerphases*, vol. 10, no. 2, p. 029518, Jun. 2015.
- [44] T. L. Riss *et al.*, *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [45] "BioTek ELx800 Absorbance Microplate Readers:Life Sciences:Life Science." [Online]. Available: <https://www.fishersci.com/shop/products/biotek-elx800-absorbance-microplate-readers-3/p-192304>. [Accessed: 22-May-2018].
- [46] A. P. Malvino, *Princípios de Eletrônica*, vol. 2. .
- [47] "LM317 3-Terminal Adjustable Regulator." [Online]. Available:
<http://www.ti.com/lit/ds/symlink/lm317.pdf>.
- [48] ZVS (Mazilli) Driver | Adam Munich.", 2010 [Online]. Available:
<http://adammunich.com/zvs-driver>. [Accessed: 15-May-2018] .
- [49] "¿Qué es y cómo se utiliza un MOSFET? | Panama Hitek." [Online]. Available:
<http://panamahitek.com/que-es-y-como-funciona-un-mosfet/>. [Accessed: 18-Jun-2018].
- [50] "Ultraviolet radiation and health." [Online]. Available:
http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/. [Accessed: 04-Jul-2018].
- [51] "Ultraviolet." [Online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ultraviolet>.
[Accessed: 04-Jul-2018].
- [52] M. Hoentsch *et al.*, "Persistent effectivity of gas plasma-treated, long time-stored

-
- liquid on epithelial cell adhesion capacity and membrane morphology,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, 2014.
- [53] D. Yan *et al.*, “Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 18339, Dec. 2015.
- [54] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, and N. Merbahi, “Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 4562, 2017.
- [55] K. Nakamura *et al.*, “Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 6085, Jul. 2017.
- [56] D. Yan *et al.*, “The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 4479, Jun. 2017.
- [57] K. D. Weltmann *et al.*, “Atmospheric pressure plasma jet for medical therapy: Plasma parameters and risk estimation,” *Contrib. to Plasma Phys.*, vol. 49, no. 9, pp. 631–640, 2009.

Apêndice

Lista dos componentes da fonte de tensão

Quantidade	Componentes
1	Transformador monofásico 220/30V 15 A
1	Ponte Retificadora 200 V 25 A
4	Condensador eletrolítico 4700 / 63 V DC
4	Transistor 2N3055
1	LM317
4	Resistências 56 Ω / 10 W
1	Resistências 270 Ω / 5 W
1	Potenciômetro 5 k Ω
1	Condensador eletrolítico 10 μ F
2	Resistências 470 Ω / 3 W
2	Resistências 10 k Ω
2	MOSFET IRFP250N
1	Bobina 47-200 μ H
2	Díodos rápidos FR107
2	Díodos Zenner 12 V 1.3 W
2	Condensadores 0,33 μ F / 50 kHz 600 VAC
1	Transformador de linhas (<i>flyback</i>)
7	Dissipadores

Diagrama final da fonte de tensão

Anexo

HGF-1



Human Gingival Fibroblasts (HGnF) Catalog #2620

Cell Specification

Fibroblasts are mesenchymal cells which perform many vital functions during development and in adulthood. They are responsible for much of the synthesis of extracellular matrix in connective tissue and play major roles in wound healing. Many diseases are associated with fibroblasts, either because fibroblasts are implicated in their etiology or because of the fibrosis that accompanies damage to other cell types. Fibroblasts are one of the most accessible mammalian cell types and one of the easiest types of cells to grow in culture. Gingival fibroblasts are the major constituents of gingival tissue and play a key role in their maintenance [1]. Human gingival fibroblasts (HGnF) express a wide variety of surface molecules including CD9, CD26, CD55, CD59, CD63, CD71, CD86 CD95, CD99 and CD117 [2]. They also express mRNAs for protease-activated receptor-1 (PAR-1) and PAR-3 [3].

HGnF from ScienCell Research Laboratories are isolated from human gingiva. HGnF are cryopreserved at passage one and delivered frozen. Each vial contains $>5 \times 10^5$ cells in 1 ml volume. HGnF are characterized by their spindle morphology and immunofluorescence with antibodies specific to fibronectin. HGnF are negative for HIV-1, HBV, HCV, mycoplasma, bacteria, yeast and fungi. HGnF are guaranteed to further expand for 15 population doublings under the conditions provided by ScienCell Research Laboratories.

Recommended Medium

It is recommended to use Fibroblast Medium (FM, Cat. #2301) for the culturing of HGnF *in vitro*.

Product Use

HGnF are for research use only. They are not approved for human or animal use, or for application in *in vitro* diagnostic procedures.

Storage

Upon receiving, directly and immediately transfer the cells from dry ice to liquid nitrogen and keep the cells in liquid nitrogen until they are needed for experiments.

Shipping

Dry ice.

References

- [1] Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota MT. (2003) "Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro." *J Periodontol.* 74(5):623-9.
- [2] Di Domenico G, Del Vecchio L, Postiglione L, Ramaglia L. (2003) "Immunophenotypic analysis of human gingival fibroblasts and its regulation by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)." *Minerva Stomatol.* 52(3):81-7, 87-91.
- [3] Tanaka N, Morita T, Nezu A, Tanimura A, Mizoguchi I, Tojyo Y. (2003) "Thrombin-induced Ca^{2+} mobilization in human gingival fibroblasts is mediated by protease-activated receptor-1 (PAR-1)." *Life Sci.* 73(3):301-10.

Instructions for culturing cells

Caution: Cryopreserved cells are very delicate. Thaw the vial in a 37°C water bath and return the cells to culture as quickly as possible with minimal handling!

Initiating the culture:

1. Prepare a poly-L-lysine-coated culture vessel (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, T-75 flask is recommended). Add 10 ml of sterile water to a T-75 flask and then add 15 μl of poly-L-lysine stock solution (10 mg/ml, Cat. #0413). Leave the vessel in a 37°C incubator overnight (or for a minimum of one hour).
2. Prepare complete medium. Decontaminate the external surfaces of medium bottle and medium supplement tubes with 70% ethanol and transfer them to a sterile field. Aseptically transfer supplement to the basal medium with a pipette. Rinse the supplement tube with medium to recover the entire volume.
3. Rinse the poly-L-lysine-coated vessel twice with sterile water and then add 15 ml of complete medium. Leave the vessel in the sterile field and proceed to thaw the cryopreserved cells.
4. Place the frozen vial in a 37°C water bath. Hold and rotate the vial gently until the contents completely thaw. Promptly remove the vial from the water bath, wipe it down with 70% ethanol, and transfer it to the sterile field.
5. Carefully remove the cap without touching the interior threads. Gently resuspend and dispense the contents of the vial into the equilibrated, poly-L-lysine-coated culture vessel. A seeding density of 5,000 cells/ cm^2 is recommended.

Note: Dilution and centrifugation of cells after thawing are not recommended since these actions are more harmful to the cells than the effect of residual DMSO in the culture. It is also important that cells are plated in poly-L-lysine-coated culture vessels to promote cell attachment.

6. Replace the cap or lid of the culture vessel and gently rock the vessel to distribute the cells evenly. Loosen cap, if necessary, to allow gas exchange.
7. Return the culture vessel to the incubator.
8. For best results, do not disturb the culture for at least 16 hours after the culture has been initiated. Refresh culture medium the next day to remove residual DMSO and unattached cells, then every other day thereafter.

Maintaining the culture:

1. Refresh supplemented culture medium the next morning after establishing a culture from cryopreserved cells.
2. Change the medium every three days thereafter, until the culture is approximately 70% confluent.

3. Once the culture reaches 70% confluency, change medium every other day until the culture is approximately 90% confluent.

Subculturing:

1. Subculture when the culture reaches 90% confluency or above.
2. Prepare poly-L-lysine-coated culture vessels ($2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) one day before subculture.
3. Warm complete medium, trypsin/EDTA solution (T/E, Cat. #0103), T/E neutralization solution (TNS, Cat. #0113), and DPBS (Ca^{++} - and Mg^{++} -free, Cat. #0303) to **room temperature**. We do not recommend warming reagents and medium in a 37°C water bath prior to use.
4. Rinse the cells with DPBS.
5. Add 8 ml of DPBS and then 2 ml of T/E solution into flask (in the case of a T-75 flask). Gently rock the flask to ensure complete coverage of cells by T/E solution. Incubate the flask in a 37°C incubator for 1 to 2 minutes or until cells completely round up. Use a microscope to monitor the change in cell morphology.
6. During incubation, prepare a 50 ml conical centrifuge tube with 5 ml of fetal bovine serum (FBS, Cat. #0500).
7. Transfer T/E solution from the flask to the 50 ml centrifuge tube (a small percent of cells may detach) and continue to incubate the flask at 37°C for another 1 to 2 minutes (no solution in the flask at this moment).
8. At the end of incubation, gently tap the side of the flask to dislodge cells from the surface. Check under a microscope to make sure that all cells detach.
9. Add 5 ml of TNS solution to the flask and transfer detached cells to the 50 ml centrifuge tube. Rinse the flask with another 5 ml of TNS to collect the residual cells.
10. Examine the flask under a microscope for a successful cell harvest by looking at the number of cells being left behind; there should be less than 5%.
Note: Use ScienCell T/E solution that is optimized to minimize cell damages due to over trypsinization.
11. Centrifuge the 50 ml centrifuge tube at 1000 rpm for 5 minutes. Resuspend cells in culture medium.
12. Count and plate cells in a new poly-L-lysine-coated culture vessel with the recommended cell density.

Caution: Handling human derived products is potentially biohazardous. Although each cell strain tests negative for HIV, HBV and HCV DNA, diagnostic tests are not necessarily 100% accurate, therefore, proper precautions must be taken to avoid inadvertent exposure. Always wear gloves and safety glasses when working with these materials. Never mouth pipette. We recommend following the universal procedures for handling products of human origin as the minimum precaution against contamination [1].

[1] Grizzle WE, Polt S. (1988) "Guidelines to avoid personal contamination by infective agents in research laboratories that use human tissues." *J Tissue Culture Methods*. 11: 191-9.

SCC-15



ATCC

Product Sheet

SCC-15 (ATCC® CRL-1623™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
**Liquid nitrogen
vapor phase**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

A 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium containing 1.2 g/L sodium bicarbonate, 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES and 0.5 mM sodium pyruvate supplemented with 400 ng/ml hydrocortisone, 90%; fetal bovine serum, 10%

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: SCC-15 (ATCC® CRL-1623™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor



Description

Organism: *Homo sapiens*, human
Tissue: tongue
Disease: squamous cell carcinoma
Age: 55 years
Gender: male
Growth Properties: adherent
DNA Profile:
Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 10,13
D13S317: 9,14
D16S539: 12,15
D5S818: 12
D7S820: 10,11
TH01: 9,9.3
TPOX: 8
vWA: 15,17



Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.



SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.



Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.



Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. It is recommended that the cryoprotective agent be removed immediately. Centrifuge the cell suspension at approximately 125 x g for 5 to 10 minutes. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in an appropriate amount of fresh growth medium.
4. Transfer the cell pellet to an appropriate size vessel. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.


1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and




Product Sheet

SCC-15 (ATCC® CRL-1623™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
**Liquid nitrogen
vapor phase**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

A 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium containing 1.2 g/L sodium bicarbonate, 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES and 0.5 mM sodium pyruvate supplemented with 400 ng/mL hydrocortisone, 90%, fetal bovine serum, 10%

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: SCC-15 (ATCC® CRL-1623™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 3

- many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
 3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 xg for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Remove medium, and rinse with 0.25% trypsin, 0.03% EDTA solution. Remove the solution and add an additional 1 to 2 mL of trypsin-EDTA solution. Allow the flask to sit at room temperature (or at 37°C) until the cells detach.

Add fresh culture medium, aspirate and dispense into new culture flasks.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 to 1:8 is recommended

Medium Renewal: Every 2 to 3 days



Cryopreservation Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

Unlike SCC-4 (ATCC CRL-1624), this line does not grow well in semi-solid medium, and does not require a feeder layer.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/17]

Declaração de ética e boas práticas

Érica Karina de Melo Pinto declara a ausência de qualquer conflito de interesse associado ao presente documento e que todo o procedimento ao nível celular foi previamente aprovado pelas entidades competentes e efetuado de forma a cumprir os procedimentos e protocolos exigidos pelo laboratório e pela FCT/UNL.

Setembro, 2018.

